



**ACTIVIDAD DE ENZIMAS ESTERASAS Y
FOSFOLIPASAS A2 COMO BIOMARCADORES DE
EFECTO DE METALES Y PESTICIDAS EN EL ROTÍFERO
DULCEACUÍCOLA *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, 1832**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(Limnología)

Presenta:

JUAN CARLOS ARIAS ALMEIDA

Director de Tesis: Dr. Roberto Rico Martínez

Comité Tutorial: Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

Dr. Jorge Ciros Pérez

Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma

Dr. Felipe Fernando Martínez Jerónimo



Ciudad de México, D.F., 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias al Dr. Roberto Rico Martínez por su dirección, comentarios, sugerencias, y estímulos recibidos durante la realización de esta investigación, pero principalmente por su voto de confianza y amistad. Mil gracias!

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Sarma, Dr. Jorge Ciro, Dra. Cecilia Vanegas, Dr. Fernando Martínez, y a mi asesor externo Dr. Alejandro Pérez Legaspi por sus sugerencias y valiosas contribuciones a fin de mejorar este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por abrir sus puertas y apoyar mi progreso profesional. A la Dra. Gloria Vilaclara, Diana, Lupita, Chantal y Gaby por su paciencia y siempre buena disposición para conmigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para mis estudios con la beca No. 271723.

A mis compañeros del PCMyL por todos las vivencias compartidas: Wez, Balam, Marcos, Cristian, Rosalina, Alma, Paula, Myriam, Omar Alfredo, Yoalli Quetzalli, y a todos aquellos que por no haberlos mencionado no son menos importantes.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y a los grandes amigos que allí encontré: Diana, Jesús, Luis Fernando, Lupita, Daniela, Silvestre, Rebeca, Sandra, Carlos V., Aarón, Araceli, Anahí, Víctor, Ulises, Ernestina, Samantha, Mónica, Laura Y., Eugenio, Marta y Lula... mil gracias por su buena vibra, apoyo, consejo... y por los buenos desayunos!

A Diana Juárez, Alejandro Rodríguez y Daniela, por brindarme su amistad y cariño sinceros.

A mi toda mi familia, por su apoyo, cariño y comprensión en esta aventura académica que emprendí.

A Laura y su hijo Gabriel, Josefina y Lorenzo, por convertirse en parte de mi familia durante mi estadía en Aguascalientes.

Finalmente a Dios por permitirme tener esta experiencia de vida...y estar conmigo siempre!

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	TOXICIDAD DE LOS METALES	2
1.2	TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS	3
1.3	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EN EL AMBIENTE ACUÁTICO	6
1.3.1	<i>Pruebas de toxicidad letal</i>	7
1.3.2	<i>Pruebas de toxicidad subletal</i>	7
1.4	BIOMARCADORES	8
1.5	PHYLUM ROTIFERA	11
2.	ANTECEDENTES	14
3.	JUSTIFICACIÓN	16
4.	HIPÓTESIS	18
5.	OBJETIVOS	18
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1	COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LA ESPECIE DE PRUEBA	19
6.2	PREPARACIÓN DE TÓXICOS Y SUSTRATOS FLUOROGÉNICOS	22
6.3	PRUEBAS DE TOXICIDAD LETAL.....	23
6.4	PRUEBAS DE TOXICIDAD SUBLETAL.....	25
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
7.	RESULTADOS	29
7.1	PRUEBAS DE TOXICIDAD LETAL.....	29
7.2	PRUEBAS DE TOXICIDAD SUBLETAL.....	34

8.	DISCUSIÓN	42
8.1	PRUEBAS DE TOXICIDAD LETAL.....	42
8.2	PRUEBAS DE TOXICIDAD SUBLETAL.....	47
9.	CONCLUSIONES.....	55
10.	RECOMENDACIONES.....	57
	REFERENCIAS.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones nominales de exposición de cinco tóxicos durante pruebas de toxicidad aguda de 48 horas (n = 5 réplicas) con neonatos del rotífero <i>E. dilatata</i>	24
Tabla 2. Concentraciones nominales de exposición a los tóxicos por 30 minutos para las pruebas de toxicidad subletal (inhibición enzimática <i>in vivo</i>) con el rotífero <i>E. dilatata</i> . n = 3 réplicas.....	27
Tabla 3. Parámetros de letalidad de las pruebas de toxicidad aguda (48h, n = 5 réplicas) con metales y pesticidas en neonatos de <i>E. dilatata</i> , según el análisis estadístico del programa DL50. Todas las concentraciones en μgL^{-1}	29
Tabla 4. Estadísticos para el porcentaje de mortalidad en el control negativo (medio EPA sin tóxico) y controles de solvente (n = 6 réplicas) durante las pruebas toxicológicas con metales y pesticidas en neonatos de <i>E. dilatata</i>	32
Tabla 5. Porcentaje de recuperación entre concentraciones nominales y reales (μgL^{-1}) durante las pruebas de toxicidad aguda (48 horas) con metales en neonatos de <i>E. dilatata</i>	33
Tabla 6. Porcentaje de recuperación entre concentraciones nominales y reales (μgL^{-1}) para las pruebas de toxicidad aguda (48 horas) con paratión metílico en neonatos de <i>E. dilatata</i>	34
Tabla 7. Valores de nivel de efecto de metales y pesticidas en neonatos de <i>E. dilatata</i> durante las pruebas de toxicidad subletal de inhibición <i>in vivo</i> de esterasas. Todas las concentraciones en μgL^{-1}	35
Tabla 8. Valores de nivel de efecto de metales y pesticidas en neonatos de <i>E. dilatata</i> durante pruebas de toxicidad subletal de inhibición <i>in vivo</i> de fosfolipasas A2. Todas las concentraciones en μgL^{-1}	39
Tabla 9. Comparación de valores de CL_{50} (μgL^{-1}) para cadmio entre la cepa del rotífero <i>E. dilatata</i> utilizada en este estudio de 48 horas y otras especies reportadas por McDaniel y Snell (1999) para un tiempo de exposición de 24 horas.....	43

Tabla 10. Comparación de valores de CL_{50} (μgL^{-1}) entre diferentes especies de rotíferos y cladóceros por exposición a cadmio, mercurio y plomo.....	44
Tabla 11. Comparación de valores de CL_{50} (μgL^{-1}) entre diferentes especies de rotíferos y cladóceros por exposición a paratión metílico.	45
Tabla 12. Comparación de los valores de CL_{50} y de CE_{50} (μgL^{-1}) para cinco tóxicos y dos sistemas enzimáticos evaluados en neonatos de <i>E. dilatata</i> . CL_{50} : Concentración Letal Media. CE_{50E} : Concentración de Efecto Medio para Esterasas. CE_{50PLA2} : Concentración de Efecto Medio para Fosfolipasas A2.....	48
Tabla 13. Comparación de valores de CE_{50} (μgL^{-1}) de inhibición de esterasas entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.....	48
Tabla 14. Comparación de valores de CE_{50} (μgL^{-1}) por inhibición de esterasas de <i>E. dilatata</i> con diferentes especies de rotíferos (CE_{50}/CE_{50}) expuestos a concentraciones subletales de cadmio.	49
Tabla 15. Comparación de valores CL_{50} y CE_{50} (μgL^{-1}) entre varios invertebrados acuáticos expuestos a concentraciones subletales de paratión metílico. Los valores corresponden a concentraciones de inhibición de esterasas en <i>E. dilatata</i> y <i>L. quadridentata</i> y de la tasa de filtración de alimento en <i>B. calyciflorus</i> y <i>D. magna</i>	50
Tabla 16. Comparación de valores CE_{50} (μgL^{-1}) de inhibición de fosfolipasas A2 entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.....	51
Tabla 17. Comparación de valores $CNOE$ (μgL^{-1}) de inhibición de fosfolipasas A2 entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de acción de metales y pesticidas sobre el axón y las sinapsis nerviosas (modificado de Pérez, 2008).	6
Figura 2. Conversión del sustrato cFDAam a fluoresceína en el interior celular por enzimas esterazas.	11
Figura 3. Alternancia de ciclos reproductivos partenogenético y sexual en el rotífero dulceacuícola <i>Euchlanis dilatata</i> (Monogononta).	13
Figura 4. Cuerpo de agua donde fue colectada la especie de prueba (<i>E. dilatata</i>) en Aguascalientes, México.....	19
Figura 5. Cultivo de la especie de prueba y su alimento. (A) Cepa del rotífero <i>E. dilatata</i> en cajas de Petri, (B) dentro de la cámara bioclimática. (C) Preparación del cultivo del alga <i>N. oculata</i> en medio basal Bold a 20-25°C.....	20
Figura 6. <i>Euchlanis dilatata</i> , especie de rotífero utilizada para pruebas toxicológicas. (A) neonato menor de 24 horas (20X). (B) Hembra partenogenética (10X).....	21
Figura 7. Toxicidad aguda a 48 horas en neonatos de <i>E. dilatata</i> por exposición a concentraciones nominales de (A) cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Log ₁₀ Concentración de tóxico vs. Mortalidad promedio (Unidades Probit) para 5 réplicas.....	31
Figura 8. Localización de fluorescencia en neonatos de <i>E. dilatata</i> expuestos a concentraciones subletales durante 30 minutos. (A, A') DDT-esterazas en corona. (B, B') Paratión metílico-fosfolipasas A2 en mástax. (C, C') Mercurio-esterazas en todo el cuerpo.....	36
Figura 9. Actividad de esterazas en neonatos de <i>E. dilatata</i> expuestos a concentraciones de cadmio donde se detectan los valores CNOE y CMOE. (A) Organismo control. (B) CNOE, 0.1 µgL ⁻¹ . (C) CMOE, 0.5 µgL ⁻¹	37

Figura 10. Inhibición de esterasas en neonatos de *E. dilatata* por exposición a concentraciones subletales. (A) Cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Concentración de tóxico (μgL^{-1}) vs. %Actividad enzimática para 3 réplicas.....38

Figura 11. Actividad de fosfolipasas A2 en neonatos de *E. dilatata* expuestos a concentraciones de plomo donde se muestran los valores CNOE y CMOE. (A) Individuo control. (B) CNOE, $1.0 \mu\text{gL}^{-1}$. (C) CMOE, $2.5 \mu\text{gL}^{-1}$39

Figura 12. Inhibición de fosfolipasas A2 en neonatos de *E. dilatata* por exposición a concentraciones subletales durante 30 minutos. (A) Cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Concentración de tóxico (μgL^{-1}) vs. %Actividad enzimática para 3 réplicas.....40

ANEXOS

Anexo 1. Medios para cultivo de rotíferos y su alimento.

RESUMEN

Se realizaron pruebas de toxicidad aguda y subletal en neonatos de *Euchlanis dilatata* con el fin de estimar y comparar los efectos ocasionados por metales y pesticidas sobre dos sistemas enzimáticos y establecer su potencial uso como biomarcadores de efecto en esta especie de rotífero dulceacuícola. Los resultados de toxicidad aguda mostraron que el DDT fue el compuesto más tóxico, seguido por los metales (Cd > Pb > Hg), mientras el paratión metílico presentó el menor efecto letal. Comparativamente, *E. dilatata* resultó ser una especie más sensible que otros organismos para los mismos tóxicos, en especial con rotíferos de los géneros *Brachionus* y *Lecane*. No obstante, la especie de prueba presentó una mayor tolerancia a la exposición al mercurio (como HgCl₂) que cladóceros como *Daphnia magna*. Así mismo, se observaron diferencias de sensibilidad en la inhibición de los sistemas enzimáticos evaluados en las pruebas subletales. Los resultados indicaron un mayor efecto debido a la exposición al cadmio y al paratión metílico sobre las esterasas. La actividad de las fosfolipasas A2 fue más sensible a los metales plomo y mercurio. El DDT afectó de forma similar ambos sistemas enzimáticos. Los resultados indican el potencial de *E. dilatata* como especie de prueba en la valoración de efectos tóxicos de sustancias contaminantes asociadas con los sedimentos y zonas litorales de ambientes dulceacuícolas.

1. INTRODUCCIÓN

La descarga de sustancias tóxicas de origen doméstico, industrial o agrícola, como metales y pesticidas, ejerce una presión importante sobre los cuerpos de agua y los recursos hidrobiológicos presentes (Díaz-Báez *et al.*, 2004; Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2006). Metales como plomo, níquel, cadmio, mercurio y cromo son considerados importantes contaminantes debido a su persistencia ambiental y tendencia a ser bioconcentrados (Atici *et al.*, 2008). Así mismo, cerca del 98% de los pesticidas agrícolas alcanzan un destino diferente a su especie blanco, incluyendo otros organismos, el aire, el agua, los sedimentos y los alimentos (Newman y Unger, 2003).

En México y otros países, los métodos más utilizados en ecotoxicología para evaluar el efecto biológico de la contaminación química de los medios acuáticos, se relacionan con el uso de especies sensibles en pruebas de toxicidad aguda y crónica (Díaz-Báez *et al.*, 2004; Mendoza-Cantú *et al.*, 2007). De esta manera, invertebrados como rotíferos y microcrustáceos (cladóceros y copépodos) son considerados como organismos ideales en dichas pruebas con diferentes parámetros de valoración (*endpoints*). Mientras las pruebas de toxicidad aguda evalúan la concentración que ocasiona un efecto letal sobre un porcentaje de los individuos (generalmente 50%), los ensayos crónicos estiman respuestas bioquímicas, fisiológicas y/o conductuales tales como actividades enzimáticas, tasas de reproducción y crecimiento, tasas de ingestión y digestión del alimento, velocidad de nado, entre otros (De Araujo *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2004). Las pruebas toxicológicas basadas en respuestas bioquímicas y/o fisiológicas a través de la evaluación de biomarcadores de exposición y de efecto, se han convertido en una herramienta útil en la detección rápida y temprana de estrés ambiental (Barata *et al.*, 2007). Tal es el caso de la evaluación de la actividad *in vivo* de enzimas esterases, glucosidasas o fosfolipasas, la cual puede ser incrementada o inhibida por la exposición a diferentes tipos de sustancias tóxicas (Burbank y Snell, 1994; Pérez-Legaspi *et al.*, 2002).

El uso de rotíferos para estudiar los efectos de los contaminantes acuáticos, es validado por la importancia de estos organismos en las redes tróficas y por su mayor sensibilidad a una amplia variedad de tóxicos (Burbank y Snell, 1994; Sarma *et al.*, 2000; Rico *et al.*, 2001). Algunas especies litorales asociadas a los sedimentos y a la materia orgánica, son usadas para evaluar los efectos tóxicos sobre estos hábitats que acumulan o absorben contaminantes (Snell y Joaquim-Justo, 2007). En México, muchas de las cuencas hidrográficas están contaminadas con concentraciones altas de xenobióticos.

Las aguas del río Lerma, por ejemplo, arrastran los desechos industriales y agrícolas provenientes de los estados de México, Guanajuato, Michoacán y Jalisco. Esto ha conducido a la contaminación de este río y del lago de Chapala con plaguicidas, residuos industriales, metales (Cr, Pb, Zn, Cd) y microorganismos patógenos, entre otros (Jaramillo *et al.*, 2009). Es aquí donde rotíferos como *Euchlanis dilatata*, considerado una especie periférica y litoral de distribución cosmopolita (Segers, 2007), puede ser utilizada como organismo de prueba en estudios ecotoxicológicos relacionados con toxicidad de sedimentos.

1.1 Toxicidad de los metales

Las emisiones volcánicas y el arrastre por erosión se identifican como fuentes naturales de metales, mientras el uso excesivo y el manejo inadecuado de residuos industriales, mineros y domésticos, ha incrementado la contaminación de los ambientes acuáticos con metales (Castañé *et al.*, 2003). Usos tan diversos y su persistencia ambiental (10-25 años) no permiten un adecuado reciclaje de metales (Ramírez, 2002), lo cual facilita su biomagnificación en las redes tróficas acuáticas y terrestres (Maldonado *et al.*, 2009). Su bioacumulación radica en la alta hidrosolubilidad y fácil absorción celular, debido a la semejanza química entre contaminantes (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu) y elementos trazas esenciales (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn) (Fisher y Hook, 2002; Walker *et al.*, 2006). Además, factores geológicos, físicos y químicos como la granulometría, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, el pH y el estado de oxidación, regulan la biodisponibilidad de los metales y su nivel de toxicidad sobre los organismos presentes en los sedimentos (Arias-Almeida y Ramírez-Restrepo, 2009) y en la columna de agua, aún en concentraciones muy bajas (Atici *et al.*, 2008).

La acción tóxica de los metales está relacionada con la inhibición de enzimas, daño estructural o funcional de organelos celulares, competencia con metales esenciales por similitud electrónica (cofactores), alteraciones endocrinas y reproductivas, inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje y/o canales activados por receptores de neurotransmisión sináptica, siendo la membrana celular y el sitio activo de las enzimas, los puntos de acción más frecuentes de los metales (Landis y Yu, 2004; Maldonado *et al.*, 2009). Así, las principales interacciones corresponden a la unión del metal a grupos tioles (-SH) de las proteínas intracelulares inhibiendo las enzimas que poseen estos grupos, y el desplazamiento del zinc de los enlaces disulfuro mediante enlaces covalentes, con la

consiguiente alteración enzimática y procesos bioquímicos asociados (Ramírez, 2002). En particular, la inserción del mercurio extiende la longitud normal de la unión disulfuro en aproximadamente 0.3nm, lo cual es suficiente para producir alteraciones conformacionales en la estructura terciaria y/o cuaternaria de proteínas con actividad enzimática (Landis y Yu, 2004).

Los metales cadmio, mercurio y plomo, ubicados entre las 10 primeras sustancias tóxicas prioritarias de la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla2007>), presentan unos límites máximos permisibles para la vida acuática en los ecosistemas de agua dulce. Por encima de estas concentraciones, los metales pueden causar trastornos graves a los seres vivos y finalmente ocasionar la muerte. Así, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha definido una concentración máxima promedio en 4 días de $0.012\mu\text{gL}^{-1}$ para mercurio, y un intervalo entre 0.66 y $2.0\mu\text{gL}^{-1}$ para cadmio y entre 1.3 y $7.7\mu\text{gL}^{-1}$ para plomo, según la dureza del agua ($50\text{-}200\text{mgL}^{-1}$) (<http://www.uclm.es/users/higueras/MAM/MMAM7.htm>).

Respecto a su producción en México, se tienen registros desde 1981 para el mercurio, principalmente en San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro, Guanajuato y Guerrero, pero la disminución de los usos comerciales a nivel internacional y local, ha reducido su producción desde 1995 a la fecha. Sin embargo, cerca de una tonelada mensual de mercurio ingresa al mercado local como subproducto de jales mineros en Guadalupe, Zacatecas (Yarto-Ramírez *et al.*, 2004). A su vez, la explotación de plomo en México se incrementó un 19.9% en promedio en 2009 con 8083 toneladas respecto al año 2008. En esta producción sobresalen los estados de Zacatecas (39.5%), Chihuahua (33.1%) y Durango (7%); otras entidades como Guerrero, Estado de México, Sinaloa y San Luis Potosí generan un 20.4% (INEGI, 2009a).

1.2 Toxicidad de los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de ellas destinadas a prevenir, controlar o destruir alguna plaga (insectos, nemátodos, malezas y vectores de enfermedades), cuyas propiedades físicas y químicas determinan su persistencia, transformación y movilidad en el ambiente (Varó *et al.*, 2008). Los residuos agrícolas y de tierras de pastoreo y los efluentes industriales de insecticidas manufacturados, son las mayores rutas de ingreso al agua (Pérez, 2008). Por tanto, la contaminación de suelos y aguas, la pérdida de biodiversidad, la aparición y proliferación de plagas resistentes, la eutrofización por

incremento de fosfatos y compuestos nitrogenados en el agua y la contaminación de alimentos, son algunos problemas ambientales derivados del uso inadecuado y de la toxicidad de los plaguicidas (Devine y Furlong, 2007; Maldonado *et al.*, 2009).

Históricamente, el uso de plaguicidas, y particularmente insecticidas organofosforados como el paratión metílico, ha estado concentrado en el noroeste de México, en donde prevalece la agricultura dedicada a cultivos de exportación; los estados del sur y centro de país se han ido uniendo poco a poco a esta tendencia (Albert, 2004). Pese a su baja persistencia (2-4 semanas) y tasa de bioacumulación (Barata *et al.*, 2004, 2007), los pesticidas organofosforados representan un riesgo ambiental ya que presentan una hidrosolubilidad muy variable y están asociados principalmente a toxicidad aguda, lo cual les confiere un importante carácter sistémico (Walker *et al.*, 2006). El paratión metílico presenta una toxicidad desde ligera a extremadamente alta para el zooplancton y los peces (CICOPLAFEST, 2004b), debido a su capacidad de penetración de membranas biológicas y conversión en paraoxón (Pérez, 2008). Este último compuesto, más tóxico que el compuesto parental, es un inhibidor efectivo de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones neuromusculares del sistema nervioso central y periférico (Forget *et al.*, 2003; Devine y Furlong, 2007). Dicho proceso involucra la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina en el sitio activo de las colinesterasas, mediante un enlace covalente plaguicida-enzima (Jaramillo *et al.*, 2009). Esta unión irreversible, origina la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, seguida de una excesiva estimulación de efectores colinérgicos (fibras nerviosas y musculares) que conduce a tetania, parálisis respiratoria y la muerte (Badii y Varela, 2008).

Por su parte, pesticidas organoclorados como el DDT, muestran baja hidrosolubilidad ($<1.0\text{mgL}^{-1}$) y un alto poder residual, lo cual favorece su acumulación en los tejidos grasos de los organismos (Menéndez, 2005) o incluso la muerte de especies no blanco debido a su baja selectividad (Valverde *et al.*, 2001). La alta persistencia ambiental (tiempo de vida media en años) de su forma original o de sus metabolitos estables (Walker *et al.*, 2006), radica en la baja volatilidad, estabilidad química y alta resistencia a la degradación microbiológica, oxidativa o solar (Calva y Torres, 1998). El DDT es altamente tóxico para los animales acuáticos (CL_{50} en μgL^{-1}), aunque hay enormes diferencias de sensibilidad entre especies (Montenegro, 2004). El DDT se puede inmovilizar en sedimentos o sólidos suspendidos en pH ácido, pero puede degradarse químicamente a DDE en pH básico, el cual es más persistente y tóxico que el insecticida original (CICOPLAFEST, 2004a). Aunque es un compuesto prohibido por la Agencia de

Protección Ambiental de Estados Unidos (Valverde *et al.*, 2001), países como México aún lo utilizan en forma restringida en la aspersion de cultivos (frijol, chile, maíz, frutales) y en campañas de salud pública (Jaramillo *et al.*, 2009).

El sitio blanco del DDT generalmente son los moduladores de los canales de sodio en los axones neuronales, los cuales son altamente sensibles a los cambios de voltaje. Se altera la transferencia de iones Na^+ y K^+ por cambios en la permeabilidad de la membrana nerviosa, lo que trae consigo la prolongación en los tiempos de cierre de estos canales y por tanto descargas repetitivas en la transmisión de los mensajes neuronales (Menéndez, 2005; Devine y Furlong, 2007). Esta hiperexcitación neuronal, manifestada con temblores y convulsiones, finalmente conduce a la muerte por parálisis muscular (Valverde *et al.*, 2001). Además el DDT inhibe la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ que tienen funciones muy importantes en la velocidad de repolarización de las neuronas (Jaramillo *et al.*, 2009). El mayor efecto ecológico observado en ecosistemas terrestres y acuáticos es la reducción en el éxito reproductivo de las especies, por lo general debido a la interferencia con sistemas enzimáticos (Connell, 2005). En la Figura 1 se presentan los principales sitios de acción de los pesticidas y de los metales dentro del sistema de transmisión nerviosa.

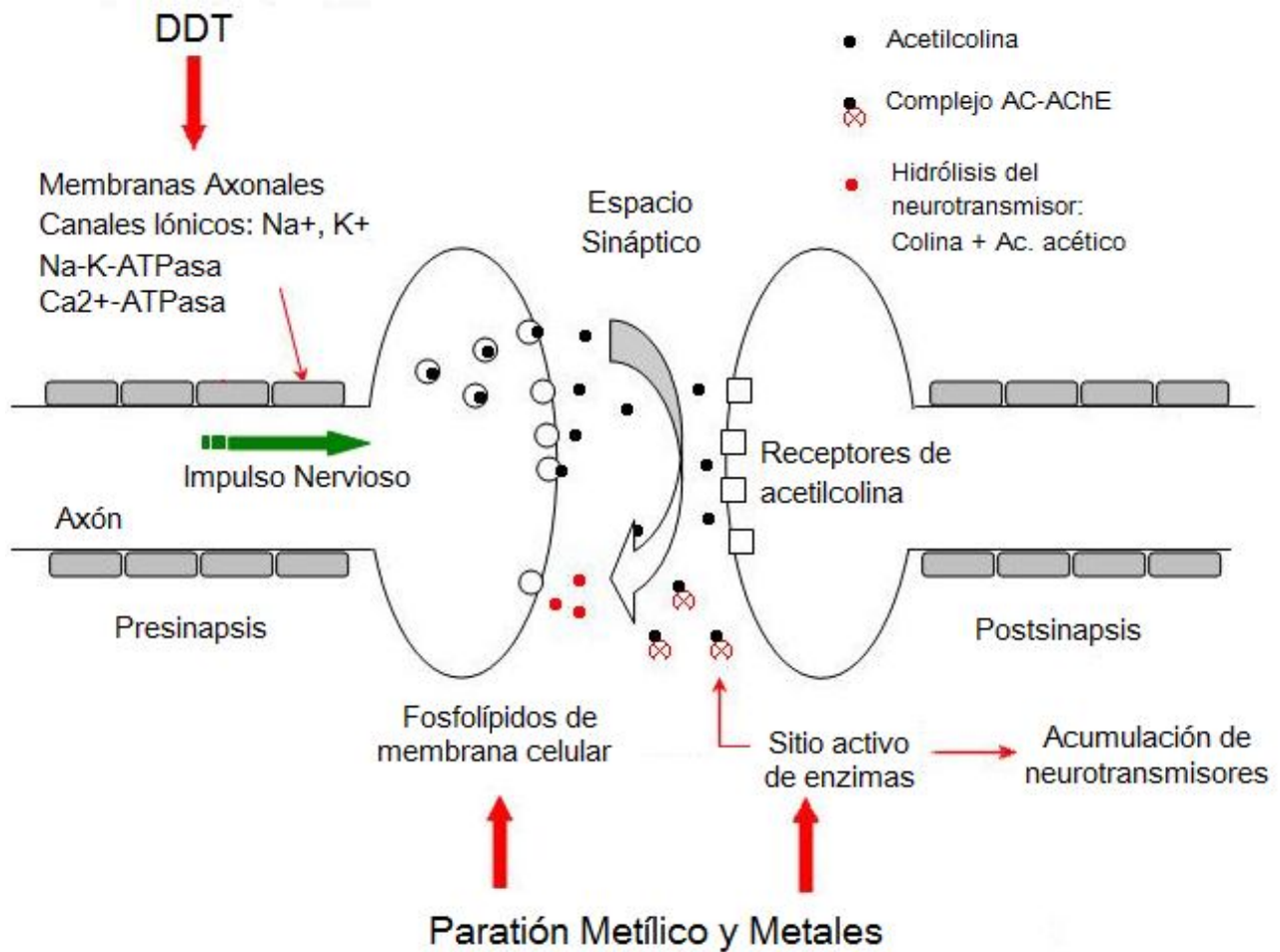


Figura 1. Sitios de acción de metales y pesticidas sobre el axón y las sinapsis nerviosas (modificado de Pérez, 2008).

1.3 Evaluación de la toxicidad en el ambiente acuático

Una de las formas para valorar los potenciales efectos adversos de los contaminantes sobre la biota acuática, consiste en la realización de pruebas de toxicidad a nivel de laboratorio (Castillo, 2004). Estos ensayos biológicos ofrecen un medio para establecer las posibles relaciones entre los tóxicos y diferentes tipos de respuesta (agudas, crónicas, genotóxicas, reproductivas, etc.) en especies de diferente nivel trófico (Palacio, 2007; Mendoza-Cantú *et al.*, 2007). Con estas pruebas se estima la concentración de una sustancia química que causará un efecto adverso sobre un organismo de prueba seleccionado, a partir de su sensibilidad y de condiciones específicas y controladas de tiempo y concentraciones de exposición (Pestana *et al.*,

2007; Martínez-Jerónimo *et al.*, 2008). La respuesta analizada es determinada con parámetros de valoración (*endpoints*) seleccionados según los objetivos del estudio, enfocados en puntos específicos de procesos metabólicos que, en última instancia, influyen en el crecimiento, la reproducción y/o la supervivencia de los organismos (Regel *et al.*, 2002). Según los efectos evaluados, las pruebas de toxicidad pueden ser letales y subletales, y agudas o crónicas, según el tiempo de exposición de la prueba (Di Giulio y Newman, 2008).

1.3.1 Pruebas de toxicidad letal

Las pruebas de toxicidad letal estiman los efectos deletéreos sobre los organismos debido a la exposición a concentraciones elevadas de tóxicos (puros o mezclas) durante un periodo de 24, 48 o 96 horas. El valor estadístico reportado es la concentración letal para el 50% de los organismos experimentales, CL_{50} , en un tiempo de exposición determinado (Peña *et al.*, 2001; Rico *et al.*, 2001). Se estima también el intervalo de confianza del 95% para el valor CL_{50} , ya que esta concentración es calculada a partir de muestras extraídas de los cultivos de la especie de prueba y no de la población en condiciones naturales. La metodología más utilizada para la estimación del valor CL_{50} consiste en la linealización de la curva concentración–respuesta, a través del cálculo del logaritmo decimal (\log_{10}) de las concentraciones de exposición (variable independiente) y la conversión del porcentaje de mortalidad a unidades Probit (variable dependiente) (Palacio, 2007). Aunque el valor CL_{50} permite comparar la sensibilidad inter e intraespecífica del organismo de prueba, este valor no puede ser asumido como una constante biológica para la especie. Factores bióticos (estado nutricional, edad, cantidad y calidad de alimento) y abióticos (fotoperiodo, temperatura, pH, tiempo de exposición), afectan este estimativo, por lo cual el valor de CL_{50} y sus límites de confianza serán válidos sólo para la especie de prueba y para las condiciones de exposición a cada tóxico (Palacio, 2007).

1.3.2 Pruebas de toxicidad subletal

La subletalidad corresponde a un tipo de toxicidad aguda donde los efectos adversos se manifiestan en forma más rápida en los organismos de ensayo, bajo condiciones de concentración y tiempo de exposición que son menores a las establecidas

en las pruebas de toxicidad letal (Rico, 2008). Con base en que la interacción inicial entre el tóxico y el sistema biológico es a nivel de biomoléculas (Choi, 2004), estas pruebas permiten determinar la subletalidad potencial de sustancias contaminantes, mediante la evaluación de alteraciones moleculares, bioquímicas y/o fisiológicas en organismos expuestos durante tiempos muy cortos a concentraciones subletales de los tóxicos (Rendón von Osten, 2005). Los contaminantes pueden ocasionar daños en blancos críticos y eludir mecanismos de defensa celular como procesos de detoxificación (i.e., citocromo P450 asociado con actividades enzimáticas, glutatión S-transferasa) y de reparación (i.e., enzimas de reparación de ADN). La detección temprana de efectos subletales identifica la toma de acciones preventivas, ya que los cambios bioquímicos son usualmente detectados antes de que los efectos adversos puedan ser percibidos en niveles superiores de organización biológica (i.e., generalmente resultan más sensibles que la mortalidad) (Choi, 2004).

Estas pruebas resultan adecuadas para evaluar las concentraciones de contaminantes frecuentemente encontradas en los ecosistemas naturales, con el potencial de alterar procesos vitales como la producción de huevos, la actividad enzimática, la síntesis de proteínas, entre otros (Fisher y Hook, 2002; Pestana *et al.*, 2007). La respuesta subletal puede ser analizada a través de parámetros de toxicidad como la concentración que produce un efecto adverso en el 50% del parámetro estudiado (Concentración Efectiva Media, CE₅₀), o bien, la concentración máxima en la cual no es afectado dicho parámetro y no se desvía significativamente de un tratamiento control; esta concentración es conocida como CNOE (Concentración donde No se Observa Efecto). Así mismo se puede establecer la cantidad mínima de un tóxico que no ejerce un efecto significativo sobre dicho parámetro respecto de un tratamiento control, la cual es conocida como CMOE (Concentración Mínima donde se Observa un Efecto) (Pérez, 2008).

1.4 Biomarcadores

Los biomarcadores son definidos como la respuesta biológica en un organismo de una población natural o experimental, como resultado de la exposición a un xenobiótico (Choi, 2004). Esta respuesta se manifiesta como alteraciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas (aspecto, pigmentación, deformaciones, etc.) (Rendón von Osten, 2005) y conductuales (Peakall y Kennedy, 1999). Estos cambios, subletales de origen y medibles dentro del organismo (Rendón von Osten, 2005), actúan como un

sistema de alarma que hace posible la detección rápida y sensible de los efectos antes de la manifestación de secuelas letales sobre la población (Barata *et al.*, 2004; Quintaneiro *et al.*, 2006). Los biomarcadores pueden ser de exposición, de efecto o de susceptibilidad. En el primer caso se determina la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos mediante la identificación de estas sustancias, sus metabolitos, o la interacción con alguna molécula o células blanco en un compartimiento del organismo. Los biomarcadores de efecto corresponden a alteraciones fisiológicas, bioquímicas o conductuales que, dependiendo de la magnitud, puede ser reconocido y asociado con el funcionamiento anormal de células, tejidos u organismos, señalando el daño potencial de los contaminantes sobre el crecimiento, la reproducción y la capacidad de supervivencia de los ejemplares experimentales (Handy *et al.*, 2003; Rendón von Osten, 2005; Rico, 2008). Por su parte, los biomarcadores de susceptibilidad hacen referencia a la capacidad inherente o adquirida en un organismo para responder a cambios de exposición a un xenobiótico específico. Por ejemplo, la variación en la expresión génica de metalotioneínas en linfocitos periféricos puede considerarse un biomarcador de susceptibilidad renal al daño causado por el cadmio (Rendón von Osten, 2005).

En esta investigación se evalúan algunos biomarcadores de efecto (esterasas y fosfolipasas A2) que participan en procesos vitales en los organismos. Las esterasas tipo B, como la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), son identificadas como sitio blanco de inhibición para organofosforados, organoclorados, carbamatos, hidrocarburos, detergentes y metales (Rank *et al.*, 2007), los cuales interaccionan con el grupo -OH de la serina del sitio activo, formando un enlace P=O (no hidrolizable). Esta unión a las esterasas tipo B inhibe su actividad enzimática (Choi, 2004), causando la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, un aumento en el efecto colinérgico e interrupción de la transmisión de impulsos nerviosos, lo cual conduce a cambios conductuales, parálisis y muerte (Locatello, 2009). Diferentes formas de esterasas pueden tener sensibilidades específicas a diferentes agentes anticolinesterasa (Quintaneiro *et al.*, 2006), por lo que la medida de su inhibición en organismos acuáticos es usada como un biomarcador de efecto de diversos contaminantes neurotóxicos (Forget *et al.*, 2003).

Las fosfolipasas son otra familia de enzimas con una importante función en la catálisis de los fosfolípidos, la cual corresponde a la generación de segundos mensajeros en la fisiología celular (Burke y Dennis, 2009). Existen fosfolipasas citosólicas, secretorias, lisosomales y calcio-dependientes, con diferente especificidad de sustrato y modo de regulación (Roberts, 1996; García-Morán *et al.*, 2008). La mayoría de las

fosfolipasas son hidrosolubles y han desarrollado el mecanismo de activación interfacial. Esto significa un incremento en la actividad catalítica de las fosfolipasas sobre sustratos agregados (micelios) en comparación con el mismo sustrato monomérico en solución (Roberts, 1996), en donde la acción de las fosfolipasas es tres órdenes de magnitud más baja (Križaj y Gubenšek, 2000). En particular, las fosfolipasas A2 (EC 3.1.1.4) se caracterizan por hidrolizar específicamente la unión éster *sn*-2 de los fosfolípidos de la membrana celular y nuclear, generando un ácido graso libre y un lisofosfolípido (Cummings *et al.*, 2000). El ácido graso liberado comúnmente es el ácido araquidónico, el cual es sintetizado en eicosanoides como las prostaglandinas (mediador inflamatorio), mientras el lisofosfolípido puede ser transformado en ácido lisofosfatídico o ser acetilado y convertido en un factor de activación de plaquetas (Peterson *et al.*, 2007; Burke y Dennis, 2009). Los mecanismos de acción tóxica que inhiben la actividad de las fosfolipasas A2 están relacionados con la alteración *in vivo* de las propiedades físicas y químicas de la bicapa lipídica por agentes tipo detergente (con grupos fosfato) o la interacción con el sitio activo u otro sitio alostérico de la molécula enzimática (Cummings *et al.*, 2000); se generan cambios en la estructura conformacional de la enzima que repercuten en la velocidad de reacción de la misma (Neet, 1995). Además, competidores iónicos con el calcio como los metales (Cd, Br, Sr, Pb), ocasionan que una cantidad excesiva de mediadores proinflamatorios en la célula neuronal, deriven en estrés oxidativo, neuroinflamación y finalmente en daño neurológico (Farooqui *et al.*, 2006).

La medición de la actividad enzimática como biomarcador de efecto, utiliza métodos fluorescentes de alta sensibilidad (Izquierdo y Henderson, 1998) basados en la inhibición de la actividad enzimática con el incremento de la toxicidad de una sustancia particular, lo cual se traduce en una reducción de la intensidad de la fluorescencia de forma dosis-dependiente (Burbank y Snell, 1994; Garzón, 2003). Estos ensayos emplean sustratos sintéticos disponibles comercialmente que liberan productos fluorescentes una vez son hidrolizados por las enzimas (Cummings *et al.*, 2000), cuya cuantificación se puede realizar *in vivo* mediante análisis de imágenes o *in vitro* con fluorimetría (de Araujo *et al.*, 2000). Por ejemplo, un sustrato con alto grado de sensibilidad en pruebas de toxicidad es el diacetato de fluoresceína (cFDAam) (Hendrickson, 1994), con capacidad de cruzar las membranas celulares y ser hidrolizado por enzimas esterasas, dando origen a la fluoresceína (Figura 2). Cuando este sustrato es excitado con luz azul ($\lambda = 490\text{nm}$), se emite una radiación fluorescente de longitud de onda correspondiente a la zona verde ($\lambda = 530\text{nm}$) del espectro (Garzón, 2003).

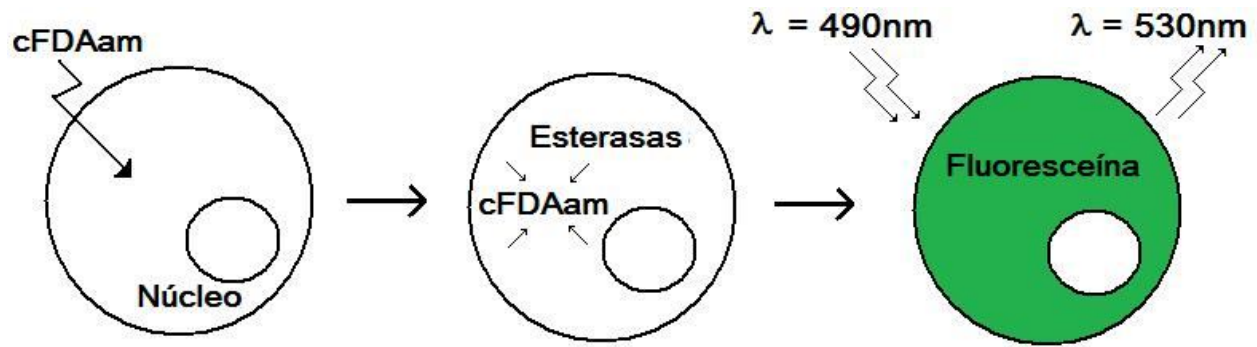


Figura 2. Conversión del sustrato cFDAam a fluoresceína en el interior celular por enzimas esterazas.

Análisis exploratorios respecto al tiempo de exposición óptimo para pruebas de toxicidad de inhibición *in vivo* de esterazas y fosfolipasas A2 con algunas especies de rotíferos como *Brachionus calyciflorus*, *Lecane quadridentata*, *Lecane luna* o *Lecane hamata*, han mostrado que un periodo de 30 minutos es satisfactorio para obtener resultados en forma rápida y que exposiciones mayores (60 minutos) no revelan incrementos significativos en la sensibilidad de las especies de prueba (Burbank y Snell, 1994; McDaniel y Snell, 1999; Pérez-Legaspi *et al.*, 2002; Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003).

1.5 Phylum Rotifera

Los rotíferos son invertebrados acuáticos con 40-2000 μm de longitud, caracterizados por una corona ciliada anterior y una faringe muscular llamada aparato masticador o mástax, provista de mandíbulas duras, los trophi (Clément y Wurdak, 1991; Gómez, 1996). La corona tiene funciones de locomoción, obtención de alimento y reconocimiento de pareja (Gómez, 1996). El mástax, en constante movimiento, varía según la especie y su hábitat alimentario (filtrador, depredador, etc.). El consumo de material suspendido, bacterias y algas filamentosas, los han clasificado como especialistas o generalistas (Arora y Mehra, 2003) aunque también existen unas pocas especies parásitas (Gómez, 1996). Su cuerpo transparente está recubierto por una cutícula rígida (lóriga) o flexible (ilorigados) (Wallace *et al.*, 2006). Algunas especies presentan el fenómeno de ciclomorfosis o variación temporal de los caracteres

morfológicos (como desarrollo de espinas), resultado de plasticidad fenotípica o factores ambientales como la presencia de depredadores (Gómez, 1996; Elías y Sarma, 1999).

Los rotíferos, que comprende unas 2030 especies (Segers, 2007), tienen relevancia ecológica en los ambientes acuáticos debido a que sus tasas reproductivas son las más rápidas entre los metazoarios, distinguiéndolos como un eslabón importante en el flujo de energía y el reciclaje de nutrientes (Wallace *et al.*, 2006).

Los rotíferos, reconocidos como indicadores de la calidad del agua, son también organismos ideales en estudios ecotoxicológicos (Snell y Janssen, 1995; Sarma, 1999; Sarma *et al.*, 2001). Estas investigaciones incluyen estimación de valores de CL₅₀ para diferentes tóxicos, estudios de tablas de vida, comportamiento y alimentación, interacciones depredador-presa, estudios bioquímicos con biomarcadores, entre otros (Snell y Janssen, 1995; Sarma *et al.*, 1998). La alta sensibilidad y rápida respuesta a los cambios ambientales, las altas tasas de crecimiento poblacional, tiempos de generación cortos, uniformidad genética (bajo reproducción partenogenética), tamaño corporal, amplia distribución, diversidad de especies, facilidad y bajos costos de cultivo en el laboratorio, favorecen la aplicación de los rotíferos como modelos biológicos en ecotoxicología acuática (Sarma *et al.*, 2000; Arora y Mehra, 2003).

Los rotíferos de la clase Monogononta, a la que pertenece la especie de prueba utilizada en este estudio, se reproducen por partenogénesis cíclica o hetegonia, la cual consiste en la alternancia de generaciones partenogenéticas y sexuales (Figura 3). Los huevos diploides de una hembra adulta originan individuos genéticamente idénticos a su madre (clones). Ante estímulos ambientales como densidad poblacional, compuestos químicos, salinidad, temperatura o cantidad y calidad de alimento, se presenta la reproducción sexual, con un dimorfismo marcado entre machos y hembras. Estos cambios ambientales inducen la aparición de hembras míticas que producen huevos haploides. De los huevos haploides no fertilizados, eclosionan machos que permanecen en el medio durante tiempos muy cortos. Si un macho encuentra una hembra portando huevos haploides y los fertiliza, se originan quistes o huevos de resistencia. Tras un periodo de latencia (diapausa) y cuando las condiciones ambientales sean favorables, los quistes darán origen a hembras amíticas que iniciarán de nuevo el ciclo partenogenético (Dodson, 2005; Wallace *et al.*, 2006).

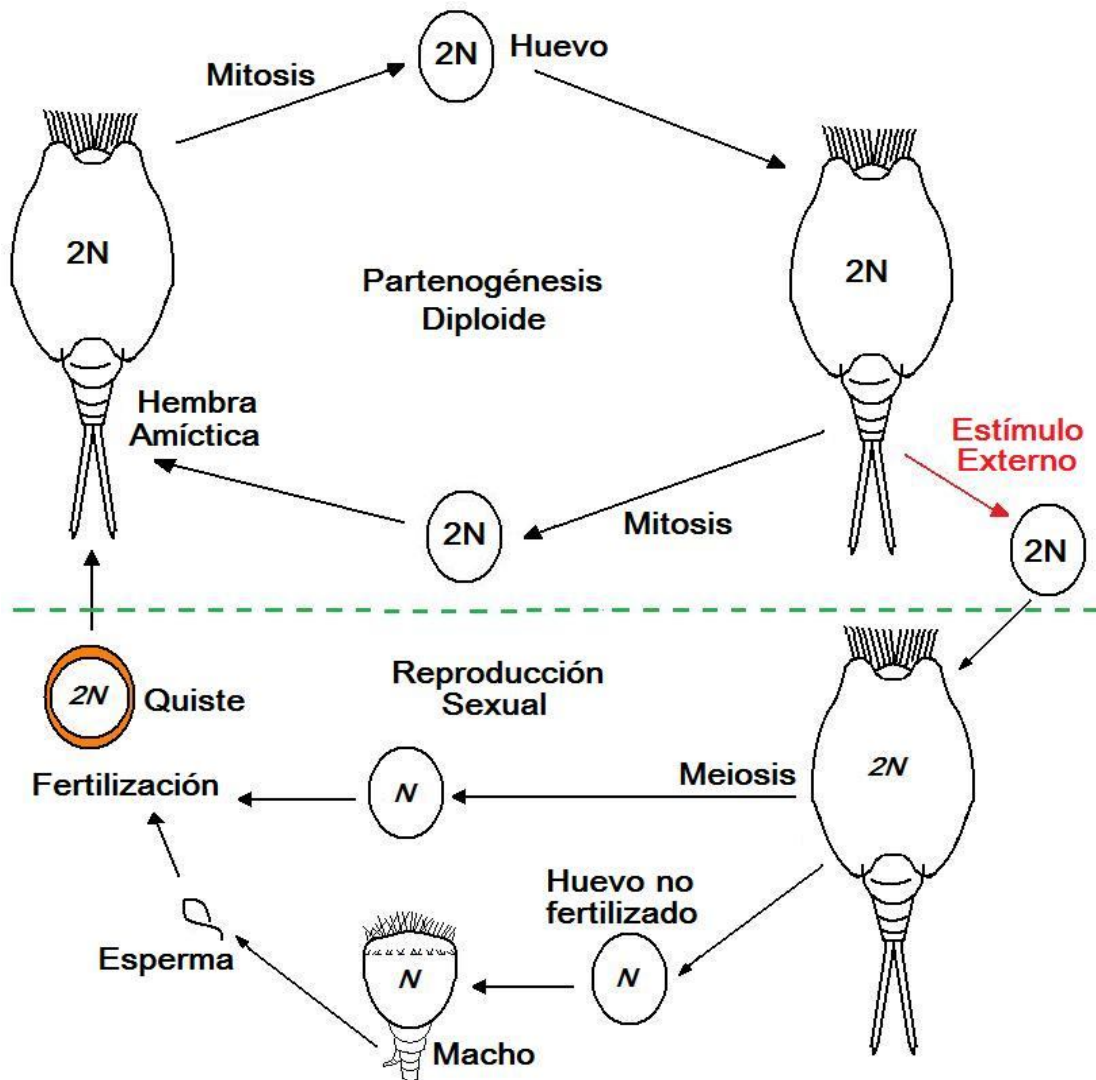


Figura 3. Alternancia de ciclos reproductivos partenogénético y sexual en el rotífero dulceacuícola *Euchlanis dilatata* (Monogononta).

Las otras clases que conforman el phylum son Seisonidea y Bdelloidea. La clase Seisonidea incluye un solo género (*Seison*) con tres especies marinas, bisexuales obligadas y epizoicas de crustáceos del género *Nebalia*. La clase Bdelloidea incluye 461 especies con reproducción partenogénetica exclusiva, con capacidad de anhidrobiosis y principalmente bentónicos o asociados con sedimentos (Clément y Wurdak, 1991; Gómez, 1996, Dodson, 2005).

2. ANTECEDENTES

Los efectos adversos derivados de la exposición a estresores ambientales han sido evaluados en diferentes especies de rotíferos a través de pruebas de mortalidad y ensayos de toxicidad subletal. Dentro de los 17 metales más investigados en rotíferos, cobre, cadmio, mercurio y plomo, aparecen en los primeros lugares de frecuencia de estudio (Snell y Janssen, 1995). El valor de CL_{50} más bajo reportado es de 0.026mgL^{-1} en *Brachionus calyciflorus* por exposición a cobre durante 24 horas (Snell *et al.*, 1991a). Por su parte, *Brachionus plicatilis* presenta una sensibilidad letal a cadmio de 39mgL^{-1} para el mismo periodo de exposición (Snell *et al.*, 1991b). Otros valores de CL_{50} para los metales mencionados también son reportados en otras especies de rotíferos (Snell y Janssen, 1995; McDaniel y Snell, 1999; Sarma *et al.*, 2000, 2001; Nandini *et al.*, 2007; Pérez-Legaspi *et al.*, 2010). Respecto a los pesticidas, los compuestos organofosforados son los más estudiados con los rotíferos, seguidos de los organoclorados. Para el paratión metílico, se reportan valores de CL_{50} entre 0.636mgL^{-1} en *Brachionus angularis* (Gama-Flores *et al.*, 2004) y 67mgL^{-1} para *B. plicatilis* (Guzzella *et al.*, 1997). Aunque el DDT es el compuesto más representativo de los organoclorados, los estudios del efecto de este pesticida en los rotíferos resultan pocos en comparación con el pentaclorofenol sódico, para el cual se reportan valores de CL_{50} entre 0.262 y 0.738mgL^{-1} para *B. calyciflorus* (Xi y Hu, 2003).

En relación a la exposición subletal a metales y pesticidas, algunos estudios señalan una inhibición entre el 40 y 80% en la actividad de enzimas glucosidasas, fosfolipasas y estererasas en el copépodo *Tigriopus brevicornis* (Forget *et al.*, 2003), el cladóceros *Daphnia magna* (Barata *et al.*, 2004, 2007) y los rotíferos *B. calyciflorus* (Burbank y Snell, 1994) y *B. plicatilis* (de Araujo *et al.*, 2000). Algunos de estos estudios contrastan la respuesta inhibitoria *in situ* entre sitios contaminados y de referencia, mientras otros evalúan la respuesta biológica *in vivo* (biomarcador) ante estresores ambientales en cultivos de rotíferos en el laboratorio. Duquesne (2006) encontró que la exposición de *D. magna* a concentraciones subletales de paratión metílico ($<2.2\mu\text{gL}^{-1}$) ocasiona la inhibición de AChE, acompañada de efectos a nivel de organismo (reducción de talla, desarrollo reproductivo y supervivencia) y de crecimiento poblacional; lo anterior demuestra la significancia de la reducción de la actividad enzimática en la dinámica poblacional, vista como la transmisión de efectos a los niveles biológicos más altos. Estos resultados han permitido la identificación de algunos sistemas enzimáticos como buenos biomarcadores de efecto durante pruebas ecotoxicológicas. La sensibilidad de ciertas

especies y la utilización de sustratos específicos durante las pruebas *in vivo* (Regel *et al.*, 2002) han favorecido el hallazgo de estos resultados.

Las pruebas de toxicidad subletal en rotíferos usando estererasas y fosfolipasas A2 como biomarcadores de efecto, han tenido un desarrollo importante en los últimos años. En 1994, Burbank y Snell observaron una reducción de la actividad enzimática *in vivo* en *B. calyciflorus* con el incremento de la concentración de compuestos tóxicos. Por ejemplo, los valores de CNOE para estererasas resultaron entre 1.6 y 5.0 veces más sensibles para fenol, cadmio, mercurio y diazinon respecto a una prueba reproductiva de 48 horas con la misma especie. Por su parte, la actividad de las fosfolipasas A2 resultó ser menos sensible para siete de los 10 compuestos analizados, en un intervalo de 1.5 a 33 veces respecto a las estererasas. Un resultado diferente encontraron Pérez-Legaspi *et al.* (2002) y Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2003) para *Lecane hamata*, *L. luna* y *L. quadridentata*. Los valores de CNOE indican una respuesta muy variable entre las especies frente a las mismas sustancias tóxicas, sugiriendo que una especie puede ser altamente sensible para un grupo de compuestos mientras otra(s) resulta(n) no serlo. En este caso, las estererasas presentaron una sensibilidad menor respecto a las fosfolipasas A2 para cobre, cadmio y mercurio. Ciertamente, la sensibilidad toxicológica subletal ha sido evaluada en géneros de rotíferos bdelloideos como *Philodina* y monogonontas como *Anuraeopsis*, *Dicranophorus*, *Epiphanes*, *Keratella*, *Lepadella*, *Ploesoma* o *Polyarthra* (Snell y Janssen, 1995); sin embargo, el uso de puntos finales relacionados con la respuesta bioquímica a la exposición de metales y pesticidas ha sido explorado en muy pocas especies de *Asplanchna*, *Brachionus*, *Lecane*, *Lepadella*, *Plationus* y *Trichocerca* (Burbank y Snell, 1994; McDaniel y Snell, 1999; Pérez-Legaspi *et al.*, 2002; Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003). Por tanto, esta investigación establecerá la efectividad de dos sistemas enzimáticos como biomarcadores de efecto para metales y pesticidas en un cultivo de laboratorio del rotífero *E. dilatata*, además de la obtención de parámetros de toxicidad letal y subletal para comparación toxicológica con otras especies de rotíferos.

3. JUSTIFICACIÓN

México cuenta con alrededor de 300 taxa de rotíferos (Rico-Martínez y Silva-Briano, 1993; Sarma, 1999) con posibilidad de ser estudiados respecto a los efectos biológicos y a la implicación ecológica del aporte de metales y pesticidas hacia los ecosistemas acuáticos (Wallace *et al.*, 2008). Por tanto, la naturaleza de tales efectos debidos a la exposición a corto y mediano plazo, aún en concentraciones subletales, debe ser estudiada con claridad (Kashiwada *et al.*, 2002). Aunque la literatura señala la evaluación de la toxicidad en un número importante de rotíferos, el uso de la inhibición enzimática *in vivo* como parámetro de efecto subletal de xenobióticos ha sido poco estudiado en especies con presencia en cuerpos de agua locales. Compuestos de uso restringido como el DDT han sido mezclados con toxafeno, parationes metílico y etílico, aldrín y dieldrín para incrementar su efectividad en el control de la malaria en regiones de Campeche, Coahuila, Chiapas, Michoacán, San Luis Potosí, entre otros (ISAT, 2010). Otras investigaciones han reportado altas concentraciones de azufre, aluminio, cadmio, mercurio, plomo y zinc, en sedimentos de la cuenca del río San Pedro, Estado de Aguascalientes, México (Mora, 2007; Torres-Guzmán *et al.*, 2010). De esta manera, la estabilidad y la persistencia de estas sustancias tóxicas en los sedimentos, supone la potencial biodisponibilidad y efectos adversos de estos compuestos sobre organismos perifíticos como el rotífero *E. dilatata*. Además, es importante considerar que las rutas de asimilación de las sustancias tóxicas pueden diferir entre taxa y, por tanto, las respuestas establecidas para ciertas especies no son necesariamente válidas para otras (DeForest *et al.*, 2007). Por ejemplo, aunque la normatividad ambiental mexicana recomienda a *D. magna* como organismo modelo en pruebas toxicológicas, este cladóceros no ocurre naturalmente en cuerpos de agua de México. Por tanto, las diferencias en las condiciones ambientales naturales de esta especie, dificultan la interpretación de la respuesta a la exposición de contaminantes tóxicos, situación que puede ser resuelta con el uso complementario -o incluso la sustitución- de especies con amplia distribución geográfica, a fin de entender mejor los efectos que puedan ser ejercidos sobre la biota acuática que se presenta en forma natural en el país (Martínez-Jerónimo y Muñoz-Mejía, 2007).

Aunque los biomarcadores han sido una importante herramienta por más de tres décadas en las investigaciones ecotoxicológicas (Fulton y Key, 2001), estos han recibido fuertes críticas sobre su alta variabilidad estacional, poca información en relación a químicos específicos y ausencia de relevancia ecológica, las cuales han sido debatidas en algunos estudios con organismos acuáticos (Quintaneiro *et al.*, 2006). Por ejemplo, la

actividad de AChE como un biomarcador de efecto específico para pesticidas organofosforados y carbamatos (Barata *et al.*, 2007), también ha sido inhibida por metales, detergentes y mezclas de contaminantes en estudios de campo. En contraste, otros estudios (Castro *et al.*, 2004; Rank *et al.*, 2007) han contribuido con el establecimiento de relaciones causales entre biomarcadores y parámetros ecológicos relevantes como reproducción, alimentación, crecimiento o conducta, llevando a que la evaluación de respuestas bioquímicas sensibles (i.e., enzimáticas) se considere uno de los mejores procedimientos para la detección de los impactos de contaminantes específicos (Choi, 2004; Rendón von Osten, 2005; Barata *et al.*, 2007).

En términos generales, los rotíferos han mostrado una alta sensibilidad a la exposición de los metales que contrasta con una baja sensibilidad a los compuestos orgánicos durante pruebas de toxicidad (Raimondo *et al.*, 2009). Esto llevaría a pesar que la respuesta de *E. dilatata* como especie cosmopolita de hábitat litoral y periférico, presente una tendencia similar a este comportamiento toxicológico. El análisis de inhibición *in vivo* con la cepa de *E. dilatata* llevaría a la obtención de una respuesta bioquímica temprana y confiable, la cual probablemente explicaría la dinámica poblacional del cultivo de prueba respecto a la exposición a los tóxicos propuestos bajo condiciones controladas de laboratorio. Las pruebas toxicológicas agudas (letales y subletales) permitirán la estimación de valores de CL₅₀ y CE₅₀, los cuales serán base para el análisis comparativo con otras especies de rotíferos expuestas a condiciones similares de estrés ambiental. Así mismo, la utilización de dos biomarcadores ayudará a una mejor explicación de la relación entre las concentraciones de exposición al contaminante antropogénico, el daño tóxico y los efectos adversos subletales en la cepa aislada de *E. dilatata*.

4. HIPÓTESIS

La exposición a concentraciones agudas en la cepa de *E. dilatata*, indicará una alta sensibilidad a metales y una baja sensibilidad a los pesticidas propuestos, presentando valores de concentración letal media comparables con otras especies de rotíferos y cladóceros para condiciones similares de cultivo y exposición a los tóxicos.

Así mismo, la exposición subletal a los tóxicos indicará un efecto de inhibición diferencial de las enzimas fosfolipasas A2 y esterazas en la cepa de *E. dilatata*, siendo la actividad enzimática de estas últimas un biomarcador de efecto más sensible a los tóxicos considerados.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad de metales y pesticidas organoclorados y organofosforados en una cepa del rotífero dulceacuícola *E. dilatata* a través de pruebas de toxicidad aguda y subletal bajo condiciones de laboratorio.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) para los metales cadmio, plomo y mercurio (como HgCl₂) y los pesticidas paratión metílico y DDT, en una cepa de *E. dilatata* a partir de pruebas de toxicidad aguda de 48 horas de exposición.
- Comparar la sensibilidad a la inhibición de los biomarcadores enzimáticos esterazas y fosfolipasas A2 entre las sustancias tóxicas consideradas, a través de la estimación de las concentraciones CE₅₀, CNOE y CMOE mediante pruebas de toxicidad subletal de 30 minutos de exposición.

CE₅₀ = Concentración que produce un Efecto sobre el 50% del parámetro evaluado.

CNOE = Concentración máxima donde No se Observan Efectos significativos respecto al control.

CMOE = Concentración Mínima donde se Observan Efectos significativos respecto al control.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta y mantenimiento de la especie de prueba

El cultivo de la cepa de *E. dilatata* fue establecido a partir de muestras colectadas en un estanque (21°44'13,7" N, 102°21'3,3" O – 1838 m.s.n.m.) de la zona rural de la ciudad de Aguascalientes, Ags., México (Figura 4), utilizando una red para zooplancton de 54µm de diámetro de la abertura de la malla. Con la ayuda de un estereoscopio óptico de disección (Olympus) y micropipetas de plástico, tres hembras adultas de *E. dilatata* fueron identificadas y transferidas a un pocillo de una placa de cultivo de poliestireno (CoStar Co., USA). Se adicionaron 500µL de agua dulce reconstituida llamada Medio EPA (US EPA, 2002) con un pH de 7.5 y dureza de 80-100mg CaCO₃·L⁻¹. Los organismos fueron alimentados con 5-6 gotas de la microalga *Nannochloris oculata* (cepa LB2194, Colección Universidad de Texas) cultivada en un medio basal Bold (Nichols, 1973). La placa se llevó a condiciones controladas de laboratorio en una cámara bioclimática (Revco Scientific, Asheville, NC, USA) con una temperatura de 25 ± 2°C, ciclos de 16:8 horas de luz blanca y oscuridad, y una intensidad luminosa de 600-1000 luxes (iluminómetro modelo 5200, Kyoritsu Electrical Instruments Works, Ltd., Japan). Estas características corresponden a condiciones ambientales estandarizadas seguidas durante pruebas de toxicidad, lo cual facilita un adecuado establecimiento de los cultivos y los análisis comparativos entre diferentes estudios y laboratorios. Los rotíferos se observaron cada 24 horas para determinar su proliferación bajo las condiciones mencionadas y así establecer el cultivo para las pruebas toxicológicas.



Figura 4. Cuerpo de agua donde fue colectada la especie de prueba (*E. dilatata*) en Aguascalientes, México.

Cuando se alcanzó un porcentaje de eclosión de huevos partenogénéticos superior al 45% en la cepa de *E. dilatata*, los organismos fueron transferidos a cajas de Petri con un volumen mayor de medio EPA y de alimento. Las cajas de Petri, el medio EPA y el alga fueron renovados cada dos o tres días. No se consideró una concentración fija de alimento, ya que esta variable no es parte de los objetivos del estudio, aunque sí se adicionó un volumen entre 1.5 y 2.0mL del cultivo del alga a cada caja de Petri del cultivo de rotíferos. Este cultivo fue renovado cada 8-10 días a fin de proporcionar a los rotíferos un alimento de buena calidad. En la Figura 5 se muestra el cultivo de *E. dilatata* en cajas de Petri bajo las condiciones de la cámara bioclimática, así como el crecimiento de *N. oculata* a temperaturas entre 20 y 25°C y que luego es conservado en refrigeración a una temperatura de 5-6°C y en la oscuridad. En el anexo 1 se presentan los reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo mencionados.

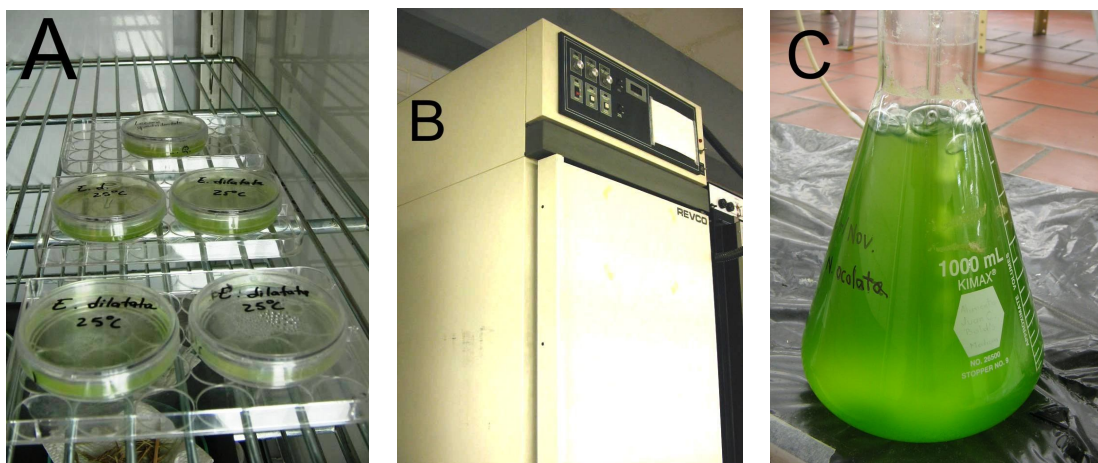


Figura 5. Cultivo de la especie de prueba y su alimento. (A) Cepa del rotífero *E. dilatata* en cajas de Petri, (B) dentro de la cámara bioclimática. (C) Preparación del cultivo del alga *N. oculata* en medio basal Bold a 20-25°C.

La cepa de *E. dilatata* se considera una especie perifítica cuya distribución y abundancia en la zona litoral está asociada con el bentos y la presencia de macrófitas (*Myriophyllum exalbescens*, *Egeria densa*), debido a factores como la morfología y edad de la planta, disponibilidad de alimento (algas verdes, diatomeas, cianobacterias filamentosas), sustrato para postura de huevos y como estrategia para disminuir el riesgo de depredación (Walsh, 1995; Duggan, 2001), originado por su mayor tamaño respecto a otros rotíferos y a su lenta velocidad de nado (Ejsmont-Karabin *et al.*, 1993).

De acuerdo con la revisión de Segers (2007), la clasificación taxonómica de esta especie es la siguiente:

Reino : Animalia
Phylum : Rotifera
Clase : Monogononta
Orden : Ploimida
Familia : Euchlanidae
Género : *Euchlanis*
Especie : *Euchlanis dilatata*

Categoría Infraespecífica (subespecie): *E. dilatata dilatata*, Ehrenberg, 1832

En la Figura 6 se muestra un neonato menor a 24 horas y un individuo adulto junto a un huevo partenogenético de la especie de prueba utilizada en esta investigación. La longitud y el ancho promedio de la lóriga de organismos adultos de esta cepa de *E. dilatata dilatata* es de $193 \pm 9.7 \mu\text{m}$ y $140.7 \pm 10.2 \mu\text{m}$ (media \pm DE, n = 20), respectivamente.

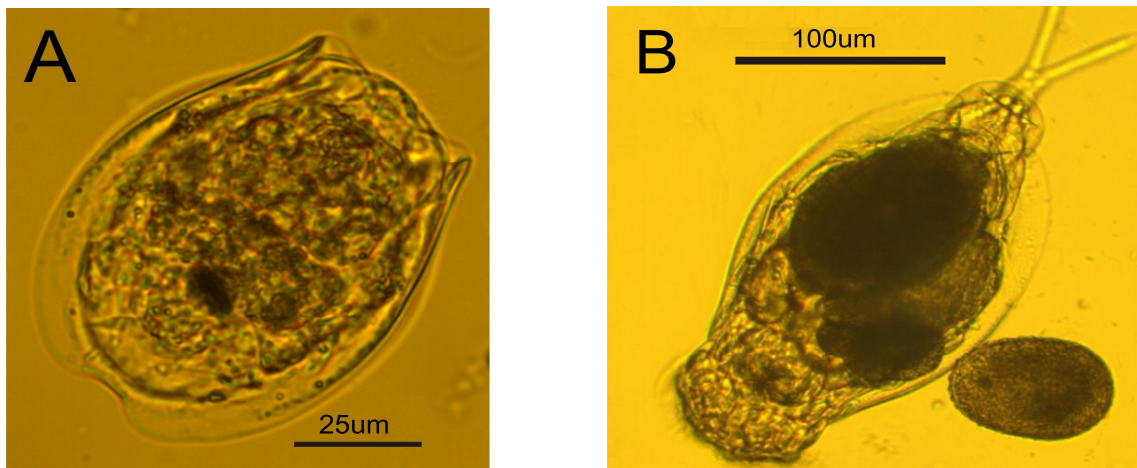


Figura 6. *Euchlanis dilatata*, especie de rotífero utilizada para pruebas toxicológicas. (A) neonato menor de 24 horas (20X). (B) Hembra partenogenética (10X).

6.2 Preparación de tóxicos y sustratos fluorogénicos

Para la preparación de los medios de cultivo y de los stocks de los diferentes tóxicos, fue utilizada agua desionizada de un sistema de desionización Water Pro System 18 M Ω (Labconco Co., Kansas City, USA). Los químicos de referencia empleados fueron de la pureza más alta disponible. Los metales plomo y cadmio fueron estándares de absorción atómica disueltos en ácido nítrico al 1% (Cd[NO₃]₂ y Pb[NO₃]₂, Sigma Co., USA) con una concentración de 1000mgL⁻¹. A partir de esta concentración fueron preparadas soluciones stock de 0.01, 0.10 y 10mgL⁻¹ para ambos metales. El mercurio se encontraba en forma liofilizada como HgCl₂ (99.9% pureza, Sigma Co., USA) siendo preparadas soluciones stock de 0.1 y 100mgL⁻¹. Todos los stocks fueron conservados a la temperatura ambiente en recipientes de vidrio debidamente sellados y rotulados.

El pesticida paratión metílico (Supelco Co., USA) se encontraba disuelto en acetona con una concentración de 1000mgL⁻¹. Fueron preparadas soluciones stock de 0.10, 0.30 y 20mgL⁻¹, siendo necesaria la adición de 100 μ L de acetona a la concentración mayor para verificar la total disolución del compuesto. La presentación granular del pesticida DDT (Sigma Co., USA) requirió su disolución en acetona (4mL) y agua desionizada antes de realizar las preparaciones de los stock de 0.1 y 50mgL⁻¹. Estos stocks fueron conservados en la oscuridad a una temperatura de 4°C aproximadamente, debidamente sellados para evitar su contaminación y pérdida por volatilización.

Los biomarcadores seleccionados son indicadores de funciones fisiológicas importantes en los organismos: esterasas como indicador de la función neuronal y neuromuscular, y fosfolipasas A₂, como indicador de la biosíntesis de segundos mensajeros de comunicación celular y de condiciones de homeostasis en el organismo. Los sustratos fluorogénicos (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) específicos para estas enzimas corresponden a cFDAam (5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethylester) para el caso de esterasas y PLA₂ (2-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino]-hexanoyl-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) para las enzimas fosfolipasas A₂. Estos sustratos producen una fluorescencia localizada principalmente en la zona del estómago y la corona de los organismos expuestos, la cual disminuye con la exposición a los tóxicos (Burbank y Snell, 1994). Ambos sustratos fueron disueltos en dimetil-sulfóxido, separados en alícuotas de 50 μ L y conservados en la oscuridad a una temperatura de -4°C.

6.3 Pruebas de toxicidad letal

Las pruebas de toxicidad letal evaluaron la sensibilidad de la especie en estudio a los diferentes contaminantes y, al mismo tiempo, permitieron establecer las concentraciones subletales para las pruebas de inhibición enzimática. Partiendo de valores de CL_{50} de rotíferos como *B. calyciflorus* (Burbank y Snell, 1994) y *L. quadridentata* (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001), se realizó una primera valoración de la toxicidad en un intervalo amplio de concentraciones. Para las pruebas definitivas fue establecido un intervalo de exposición a los tóxicos donde se cumplían como mínimo las siguientes condiciones: (1) la concentración más baja con el 100% de mortalidad; (2) la concentración donde muere más del 65% de los animales de prueba; (3) la concentración que causa una mortalidad alrededor el 35% y (4) un control negativo en donde se presenta una mortalidad máxima del 10%, esto último a fin de considerar como válida cada réplica.

Las pruebas toxicológicas agudas siguieron el protocolo propuesto por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001). Se llevaron 200 huevos partenogénicos en medio EPA y sin alimento a la cámara con temperatura e iluminación controladas ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclos de 16:8 horas de luz blanca y oscuridad), para la obtención de neonatos menores de 24 horas de eclosionados requeridos para las pruebas. Al siguiente día, para el control negativo (medio EPA), el control solvente (acetona, ácido nítrico, agua desionizada) y cada concentración del tóxico a evaluar (Tabla 1), fueron puestas 10 hembras neonatas juntas en un pocillo (3mL de capacidad total) de una placa de cultivo de poliestireno (CoStar Co., USA), utilizando un estereoscopio óptico y una pipeta plástica de transferencia. La prueba se desarrolló durante 48 horas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y ciclos de 16:8 horas de luz blanca y oscuridad en la cámara bioclimática, en un volumen de exposición de 1mL, sin recambio de medio EPA y sin alimento. Para el DDT, el volumen de prueba fue de 3mL en placas independientes para cada concentración ya que, aparentemente, existía una transferencia de tóxico entre tratamientos por volatilización, lo que conducía a efectos letales incoherentes en todas las concentraciones. Después del tiempo de exposición, se registró el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento y control. La mortalidad máxima en los diferentes controles fue menor o igual al 10% con el fin de considerar como válida una réplica de las pruebas. Si este porcentaje era superior, la réplica se consideraba inválida. Los animales sin respuesta a la estimulación mecánica (movimiento corporal o mástax), fueron considerados como organismos muertos. Siguiendo el mismo procedimiento, se realizaron cinco réplicas en diferentes días para

cada tratamiento con sus respectivos controles negativo y solvente, lo cual ayuda a asegurar una mayor aleatoriedad en la selección y exposición de los organismos de prueba. Este número de réplicas se considera estadísticamente representativo para la estimación del valor de CL₅₀.

Tabla 1. Concentraciones nominales de exposición de cinco tóxicos durante pruebas de toxicidad aguda de 48 horas (n = 5 réplicas) con neonatos del rotífero *E. dilatata*.

Tóxico	Concentraciones agudas (μgL^{-1})
Cadmio	0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 50, 100, 250, 500, 2500
DDT	0.0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2}
Mercurio	0.0, 10, 25, 50, 150, 250, 500, 1000, 2500
Paratión Metílico	0.0, 0.1, 1.0, 5.0, 50, 100, 5000, 15000, 20000
Plomo	0.0, 0.1, 0.5, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000

Para cada una de las réplicas de las pruebas agudas con los diferentes tóxicos, además del control negativo (medio EPA sin tóxico), se realizaron controles con los solventes donde estaban disueltos los tóxicos. Esto con el fin de descartar posibles efectos del solvente sobre la mortalidad de los neonatos y asegurar un efecto letal debido solamente a los tóxicos. De esta manera, 4mL de acetona se diluyeron en 21mL de medio EPA, volumen requerido en la preparación del stock de 50mgL^{-1} de DDT. Se preparó una solución de ácido nítrico al 1% disuelto en medio EPA, puesto que los estándares de absorción atómica (Cd, Pb) están disueltos a esta concentración de ácido nítrico. Finalmente, se preparó una muestra con 100 μL de acetona en un volumen de 25mL de medio EPA como cuando se preparó el stock de 20mgL^{-1} de paratión metílico. Como el medio EPA está compuesto de sales disueltas en agua desionizada, también se realizó un control con este tipo de agua. Para cada uno de estos controles se realizaron 6 réplicas, cada una constituida por 10 hembras neonatas (<24horas) junto a 1mL del control solvente en un pocillo de la placa de cultivo, la cual fue llevada a las mismas condiciones ambientales de las pruebas de toxicidad aguda (48 horas, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y ciclos de 16:8 horas de luz y oscuridad en la cámara bioclimática).

Para verificar el grado efectivo de exposición de los organismos, se cuantificaron las concentraciones reales de los metales estudiados, para lo cual se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica y el equipo AAnalyst-100 (PerkinElmer, USA). Fueron elegidas al azar tres concentraciones de las soluciones stock de cada metal, utilizadas en las pruebas de toxicidad aguda. Con el módulo HGA-800 de este equipo, se utilizó la técnica de horno de grafito para la cuantificación de cadmio y plomo, mientras para el mercurio fue aplicada la técnica de generación de hidruros con el módulo MHS-10. El método analítico de estimación (WPCF, AWWA, APHA, 1989) de la concentración real de exposición fue 3030E para cadmio, 3113B para plomo y 3112B para mercurio. El límite de detección del equipo absorción atómica fue de $0.05\mu\text{gL}^{-1}$ para cadmio, $1.5\mu\text{gL}^{-1}$ para plomo y $0.3\mu\text{gL}^{-1}$ para mercurio.

Así mismo, las concentraciones reales de cinco concentraciones nominales del pesticida paratión metílico seleccionadas al azar, fueron estimadas por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta definición (HPLC). Se empleó un cromatógrafo VARIAN modelo CP-3800 con la siguiente programación: Inyector a 250°C y 10psi para un volumen de muestra de $1.0\mu\text{L}$; flujo del gas acarreador (H_2) de $4.5\text{mL}/\text{min}$; detector a 300°C y una corriente de esfera de 3.2 Amperios. La columna (CP-Sil 5 CB: $15\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$, Varian Capillary Column) tuvo un régimen de temperatura de 80°C durante 1 minuto hasta alcanzar los 250° , con una rampa de $20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. El análisis cuantitativo (concentración real) se realizó por medio de los cromatogramas obtenidos para cada una de las concentraciones nominales calculadas y preparadas a partir de la solución estándar. El límite de detección del equipo fue de $0.1\mu\text{gL}^{-1}$ y el método analítico utilizado fue 8321A (US EPA, 1989).

6.4 Pruebas de toxicidad subletal

Para realizar estas pruebas de toxicidad subletal, se establecieron las concentraciones nominales de la Tabla 2 con valores entre 0.3 y 0.5 veces el valor estimado de CL_{50} . El parámetro de valoración en estos ensayos fue la inhibición enzimática *in vivo* de esterasas y fosfolipasas A2 por exposición a los tóxicos, según el protocolo de Burbank y Snell (1994) y algunas modificaciones de Pérez-Legaspi *et al.* (2002) y Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2003). Cada prueba se inició con la transferencia de 25 hembras neonatas (<24horas) a un pocillo de una placa de cultivo junto con $750\mu\text{L}$ de medio EPA, lo cual corresponde al control negativo (medio EPA sin tóxico). Así

mismo, 25 hembras neonatas por pocillo junto a 750 μ L de cada una de las concentraciones del tóxico formaron los diferentes tratamientos (Tabla 2). Los organismos se expusieron al tóxico durante 30 minutos en la cámara bioclimática a 25°C, sin alimento y en la oscuridad. A continuación se agregaron 2 μ L (5 μ M) de sustrato cFDAam (esterasas) a cada pocillo y se agitó la placa suavemente. Después de la incubación con el sustrato durante 15 minutos, se agregaron 25 μ L de formol (10%) en cada pocillo con el fin de suspender la actividad enzimática y fijar los rotíferos. Del control y de cada tratamiento fueron seleccionados 15 neonatos al azar y transferidos a un portaobjetos para su observación (10X) en un microscopio invertido LEICA DMLS, acondicionado con una lámpara de mercurio como fuente de epifluorescencia, con un espectro de excitación entre 450 y 490nm y un filtro contra emisiones de 515nm. Por medio de una cámara INFINITY 3 y el software INFINITY CAPTURE versión 4.6.0 (Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada) se realizó el registro fotográfico de la fluorescencia obtenida en cada neonato, observándose una mayor intensidad en el área de la corona y el tracto digestivo del organismo.

La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada usando el programa de análisis de imágenes Kodak Digital Science 1D (Scientific Imaging Systems, Nashua, NH, USA), donde fue dibujado un círculo que incluía la mayor cantidad de fluorescencia sobre el cuerpo del neonato, obteniéndose un valor de fluorescencia media. Aunque el programa no permitía definir un diámetro fijo para este círculo, el tamaño constante de los neonatos y el nivel de fluorescencia observado, hacía posible precisar un diámetro aproximadamente constante en cada una de las mediciones. De esta manera, por diferencia con la fluorescencia obtenida con el mismo círculo en el fondo oscuro, se obtuvo la fluorescencia media total de cada neonato para el sistema enzimático en evaluación.

Se realizaron tres réplicas con este mismo procedimiento en diferentes días para un número total de 45 datos para el control y cada concentración del tóxico. Este mismo procedimiento fue llevado a cabo para medir el efecto de los diferentes tóxicos sobre las fosfolipasas A2, con la diferencia de que se adicionó 1 μ L (17.2 μ M) del sustrato fluorogénico PLA2.

Tabla 2. Concentraciones nominales de exposición a los tóxicos por 30 minutos para las pruebas de toxicidad subletal (inhibición enzimática *in vivo*) con el rotífero *E. dilatata*. n = 3 réplicas.

Tóxico	Concentraciones subletales (μgL^{-1})
Cadmio	0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10
DDT	0.0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}
Mercurio	0.0, 0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 12, 25, 50, 100
Paratión Metílico	0.0, 4.68, 9.37, 18.75, 37.5, 75, 150
Plomo	0.0, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25

6.5 Análisis estadístico

Con los datos de mortalidad de las pruebas agudas y el programa DL50 (Institute Regional of Cotton Technology, Montpellier, Francia), se estimó la concentración de tóxico que causa un efecto letal sobre el 50% de los organismos expuestos a través del método Probit. Ese método se basa en la cuantificación probabilística de la relación entre la intensidad de un estímulo (tóxicos) y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo (mortalidad). Una vez calculados los parámetros del modelo, se realizó una prueba de bondad de ajuste para contrastar la hipótesis nula de que el modelo ajusta bien a los datos. Para ello se comparan las probabilidades estimadas por el modelo con las proporciones realmente observadas mediante el estadístico χ^2 ($p \leq 0.05$) (Serrano, 2003). Cuando se verificó la linealidad del modelo, fueron estimados el intervalo de confianza del 95% para el valor de CL_{50} , el coeficiente de determinación (r^2) y la ecuación de la recta (regresión lineal entre el logaritmo decimal de las concentraciones del tóxico y el porcentaje de mortalidad en unidades probit).

Por medio del análisis de varianza de una vía con el programa Statistica versión 7.0 (StatSoft Inc., 2004), se determinó la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre la media de cada tratamiento y el control negativo. Una vez confirmadas tales diferencias significativas, fue aplicada la prueba de Duncan de comparación de medias (prueba post-hoc) para la estimación de las concentraciones CNOE y CMOE en cada tóxico. Este tipo de prueba aplica para un mismo número de

datos por tratamiento y resultó ser más sensible que la prueba de comparación de medias de Tukey, también evaluada.

Con los datos de la fluorescencia media de las pruebas subletales, se realizó un análisis de varianza de una vía para verificar la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la media del control y la media de cada una de las concentraciones del tóxico. Cuando fueron verificadas tales diferencias, se aplicó un análisis de comparación de medias de Duncan (prueba post-hoc) para determinar los valores de CNOE y de CMOE. A continuación, se realizó una regresión lineal para la obtención del valor de CE_{50} y su respectivo intervalo de confianza al 95%, tomando como variable independiente la concentración del tóxico y como variable dependiente la intensidad de fluorescencia media, como una medida indirecta del efecto inhibitorio de las enzimas. Este análisis estadístico fue realizado con el programa Statistica versión 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas de toxicidad letal

Los valores estimados de CL_{50} y otros parámetros de letalidad para los cinco tóxicos evaluados se presentan en la Tabla 3. Los valores de CL_{50} estuvieron en el intervalo de 2.67×10^{-4} a $607.1 \mu\text{gL}^{-1}$ indicando una alta sensibilidad de la cepa de *E. dilatata* a los efectos tóxicos del pesticida DDT, una sensibilidad media frente a los metales y una respuesta menos sensible respecto al paratión metílico, según el programa DL50. Se obtuvo así una proporción de 2273 entre el valor más alto y más bajo estimados.

Tabla 3. Parámetros de letalidad de las pruebas de toxicidad aguda (48h, n = 5 réplicas) con metales y pesticidas en neonatos de *E. dilatata*, según el análisis estadístico del programa DL50. Todas las concentraciones en μgL^{-1} .

Parámetro	Tóxico				
	Cadmio	DDT	Mercurio	Paratión Metílico	Plomo
CL_{50}	18.6	2.67×10^{-4}	164.2	607.1	38.5
LC95%	7 – 46	1.56×10^{-4} - 4.56×10^{-4}	119 - 225	317 - 1 160	15 - 101
r^2	0.95	0.80	0.74	0.84	0.97
CV (%)	31.1	43.4	44.8	54.0	25.9
Regresión	$y = 6.28 + 0.74x$	$y = 7.47 + 0.96x$	$y = 6.13 + 1.44x$	$y = 5.11 + 0.53x$	$y = 5.82 + 0.58x$
CNOE	0.5	1×10^{-6}	10.0	1.0	0.5
CMOE	1.0	1×10^{-5}	25.0	5.0	1.0

CL_{50} = Concentración letal media de la cepa de prueba para cada tóxico.

LC95% = Límites de confianza del 95% para el valor estimado de CL_{50} .

r^2 = Coeficiente de determinación.

CV = Coeficiente de variación promedio entre réplicas (n = 5) de los tratamientos para la estimación del valor de CL_{50} .

Regresión = Análisis de regresión lineal simple entre la mortalidad de neonatos (unidades Probit, variable dependiente "y") y la concentración nominal del tóxico (logaritmo decimal $-\text{Log}_{10}$, variable independiente "x" en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

CNOE = Concentración máxima donde No se Observan Efectos significativos respecto al control.

CMOE = Concentración Mínima donde se Observan Efectos significativos respecto al control.

El análisis de regresión lineal permitió obtener una ecuación que expresa la relación entre la mortalidad y la exposición a cada tóxico. Por tanto, con esta expresión será posible realizar la estimación de un valor de concentración del contaminante que causará un efecto letal sobre un porcentaje en particular de la cepa de prueba de *E. dilatata*. Por ejemplo, la concentración estimada de cadmio que ocasionará una mortalidad del 30% y del 80% sobre hembras neonatas de *E. dilatata* es de $0.037\mu\text{gL}^{-1}$ ($=\text{CL}_{30}$) y 211mgL^{-1} ($=\text{CL}_{80}$), respectivamente. Una interpretación similar puede aplicarse a los demás tóxicos. La representación gráfica del análisis de regresión lineal entre la mortalidad (unidades Probit) y el logaritmo decimal de las concentraciones nominales para cada tóxico se presenta en la Figura 7, observándose un buen ajuste de la curva concentración-respuesta.

Los coeficientes de determinación (r^2) oscilaron entre 0.74 (mercurio) y 0.97 (plomo), lo cual indicaría que una alta proporción en la variación de la mortalidad de los organismos puede ser explicada por, o se debe a, la variación de las concentraciones agudas de exposición de los diferentes tóxicos. Se obtiene así una dependencia significativa de la variable mortalidad respecto a la concentraciones de exposición (variable independiente). El coeficiente de variación (CV) promedio entre las cinco réplicas de cada tratamiento se calculó entre 25.9 y 54.0%. Estos valores se explican por la diferencia de datos de mortalidad entre réplicas para una misma concentración de tóxico, en especial para aquellas más bajas. Por ejemplo, para $0.1\mu\text{gL}^{-1}$ de paratión metílico se registró un neonato muerto de 50 individuos en exposición en las 5 réplicas, lo cual origina un CV de 223.6% (máxima entre todos los tóxicos). Este valor contrasta con el CV de 0% encontrado para 20mgL^{-1} del mismo pesticida, donde hubo una mortalidad del 100% de los organismos expuestos.

La concentración mínima donde se detectan efectos letales sobre los ejemplares de prueba tiene un valor de $1.0\mu\text{gL}^{-1}$ para el cadmio y el plomo, lo cual sugiere su alto poder tóxico. Por su parte, los efectos agudos del mercurio empiezan a presentarse a partir de una concentración 25 veces mayor (Tabla 3). Con los pesticidas, los efectos letales aparecen a concentraciones muy bajas, en especial para el DDT, señalando la alta sensibilidad de la cepa de *E. dilatata* a este compuesto organoclorado (toxicidad 100000 veces superior al cadmio). El pesticida organofosforado también presenta un efecto importante, pero es menos letal al ser comparado con los otros tóxicos evaluados.

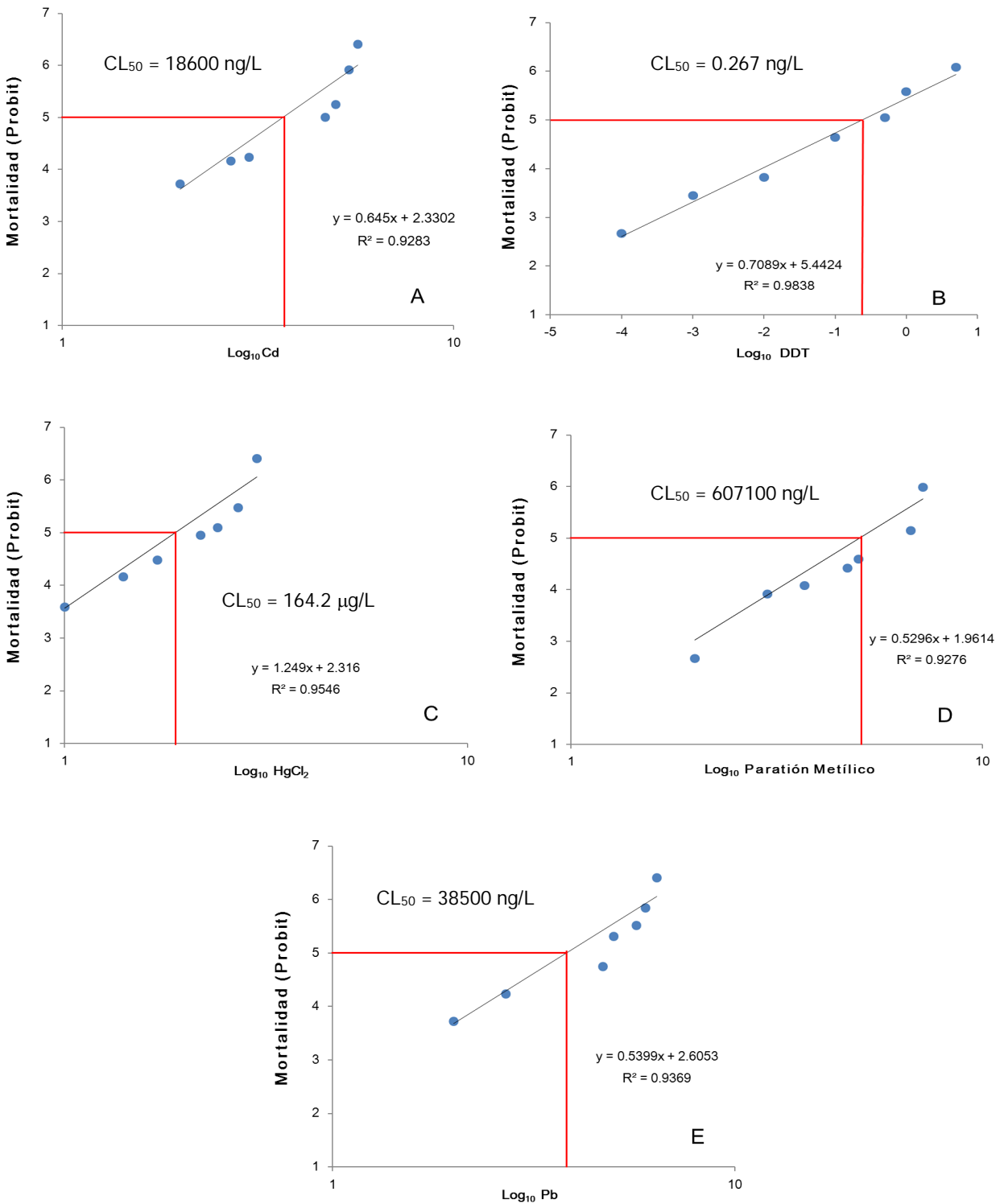


Figura 7. Toxicidad aguda a 48 horas en neonatos de *E. dilatata* por exposición a concentraciones nominales de (A) cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Log₁₀ Concentración de tóxico vs. Mortalidad promedio (Unidades Probit) para 5 réplicas.

Los valores estimados de CL_{50} indican que el DDT es el compuesto más tóxico sobre la cepa de *E. dilatata*, seguido de una sensibilidad media a los metales y finalmente una susceptibilidad más baja a la acción tóxica del pesticida organofosforado, para un tiempo de exposición de 48 horas y sin alimento disponible para organismos de prueba.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas de control con los solventes. Se observa que la máxima mortalidad en el control negativo se observó en los metales, mientras la acetona fue el solvente con mayor efecto letal sobre los neonatos. En ninguno de los solventes evaluados fue superado el límite máximo permitido del 10% de mortalidad, condición que permite dar validez a los resultados de las diferentes réplicas en las pruebas toxicológicas agudas.

Tabla 4. Estadísticos para el porcentaje de mortalidad en el control negativo (medio EPA sin tóxico) y controles de solvente (n = 6 réplicas) durante las pruebas toxicológicas con metales y pesticidas en neonatos de *E. dilatata*.

Parámetro	Control Negativo		Control Solvente		
	Metales	Pesticidas	Acetona	Agua desionizada	HNO ₃ , 1%
Media (%)	3.3	2.0	3.3	1.7	1.7
Desviación Estándar	4.8	4.2	5.2	4.1	4.1

Los resultados de la cuantificación de concentraciones reales de los metales (Tabla 5) muestran un porcentaje de recuperación alto, lo cual indica que las concentraciones reales son muy similares a las cuales estuvieron expuestos los organismos durante las pruebas. Sin embargo, las concentraciones reales fueron más bajas que sus equivalentes nominales. El porcentaje obtenido con el mercurio probablemente sea debido a que las soluciones fueron preparadas a partir de un compuesto inorgánico en estado sólido y no a partir de un estándar de absorción atómica (Pb, Cd). Los cálculos para las concentraciones de prueba se hicieron con HgCl₂ como 100% de mercurio, siendo en realidad solo el 74% del compuesto. Adicionalmente, la cantidad de reactivo pesado fue muy reducido por lo que no se descartan errores humanos en el procedimiento mismo de preparación de los stocks.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación entre concentraciones nominales y reales (μgL^{-1}) durante las pruebas de toxicidad aguda (48 horas) con metales en neonatos de *E. dilatata*.

Metal	Concentración nominal	Concentración real	Porcentaje de recuperación
Cadmio	0.5	0.4	80.0
	0.5	0.5	100.0
	100	74	74.0
	100	69	69.0
	500	411	82.2
	500	437	87.4
	Media \pm D.E.		82.1 \pm 7.1
Plomo	0.5	0.5	100.0
	0.5	0.5	100.0
	250	200	80.0
	250	190	76.0
	2500	2290	91.6
	2500	2380	95.2
	Media \pm D.E.		90.5 \pm 1.8
Mercurio ⁽¹⁾	18.5	11.2	60.5
	18.5	10.6	57.3
	111	72.3	65.1
	111	90.5	81.5
	370	367	99.2
	370	306	82.7
	Media \pm D.E.		74.4 \pm 8.5

¹ Las concentraciones cuantificadas corresponden al 74% de la concentración nominal correspondiente, valor que representa el porcentaje de mercurio en el peso molecular de HgCl_2 . Así, las concentraciones nominales de 25, 150 y 500 μgL^{-1} corresponden a las concentraciones de 18.5, 111 y 370 μgL^{-1} , respectivamente.

En la Tabla 6 se presentan los resultados del análisis por cromatografía de líquidos para el paratión metílico. Las concentraciones reales resultan mayores a sus equivalentes nominales, salvo para 5 y 5000 μgL^{-1} . Lo anterior sugiere que efectivamente los organismos estuvieron expuestos a concentraciones más altas de las inicialmente sugeridas durante las pruebas de toxicidad aguda. Para el DDT, estas pruebas no fueron realizadas debido a las bajas concentraciones nominales evaluadas con este pesticida, sumado a limitaciones de los componentes operacionales (columna, detector) con los cuales actualmente cuenta el equipo de cromatografía de líquidos disponible.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación entre concentraciones nominales y reales (μgL^{-1}) para las pruebas de toxicidad aguda (48 horas) con paratión metílico en neonatos de *E. dilatata*.

Pesticida	Concentración nominal	Concentración real	Porcentaje de recuperación
Paratión metílico	15 000	15 000	100.0
	15 000	15 125	100.8
	5000	2981.4	59.6
	5000	4912.1	98.2
	100	230	230.0
	100	310	310.0
	50	90	180.0
	50	80	160.0
	5	4	80.0
	5	5	100.0
	Media \pm D.E.		141.9 \pm 22.5

7.2 Pruebas de toxicidad subletal

Aunque inicialmente se consideró un factor de 1/10 del valor estimado de CL_{50} para establecer las concentraciones subletales para cada tóxico, el análisis estadístico no indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control durante las pruebas. Por tanto, se realizaron pruebas preliminares con concentraciones entre 1/3 y 1/2 de la concentración letal media, observándose la supervivencia de los

neonatos después de la exposición a los tóxicos durante 30 minutos y a la incubación con los sustratos fluorogénicos durante 15 minutos. Bajo estas condiciones experimentales, se presentaron diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos, resultado que indicó concentraciones subletales de exposición para el parámetro bioquímico en evaluación (actividad enzimática). De esta manera, con las concentraciones subletales indicadas en la Tabla 2 para cada tóxico, se obtuvieron 45 fotografías de inhibición enzimática en el control y en cada uno de los diferentes tratamientos de cada tóxico estudiado, y en forma independiente para esterasas y fosfolipasas A2.

Las pruebas toxicológicas subletales permitieron observar una actividad enzimática localizada principalmente en la corona (esterasas) y en el mástax (fosfolipasas A2) de los organismos, y en algunos casos en gran parte del cuerpo de los neonatos (Figura 8). En particular, la Figura 9 muestra la reducción en la intensidad de la fluorescencia conforme se incrementa la concentración del tóxico (Cd) y posterior degradación del sustrato cFDAam hasta fluoresceína en neonatos de *E. dilatata*. Los resultados de las pruebas subletales de inhibición de esterasas son indicados en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de nivel de efecto de metales y pesticidas en neonatos de *E. dilatata* durante las pruebas de toxicidad subletal de inhibición *in vivo* de **esterasas**. Todas las concentraciones en μgL^{-1} .

Tóxico	CNOE	CMOE	CE ₅₀	LC95%	CV (%)	r ²
Cadmio	0.1	0.5	5.5	3.8 – 7.2	26.7	0.89
DDT	1x10 ⁻⁸	1x10 ⁻⁷	7.9x10 ⁻⁷	6.21x10 ⁻⁷ – 1.01x10 ⁻⁵	21.7	0.88
Mercurio	6.0	12	57.6	40.3 – 74.8	13.9	0.85
Paratión Metílico	9.4	18.7	61.9	30.5 – 93.3	40.8	0.75
Plomo	2.5	5.0	20.8	17.5 – 24.0	2.0	0.96

CNOE = Concentración donde No se Observan Efectos significativos respecto al control.

CMOE = Concentración Mínima donde se Observan Efectos significativos respecto al control.

CE₅₀ = Concentración donde se observa un Efecto significativo sobre el 50% del parámetro valorado (inhibición de la actividad de esterasas).

LC95% = Límites de Confianza al 95% para el valor de CE₅₀.

CV = Coeficiente de variación entre réplicas (n = 3) de los tratamientos para la estimación del valor CE₅₀.

r² = Coeficiente de determinación.

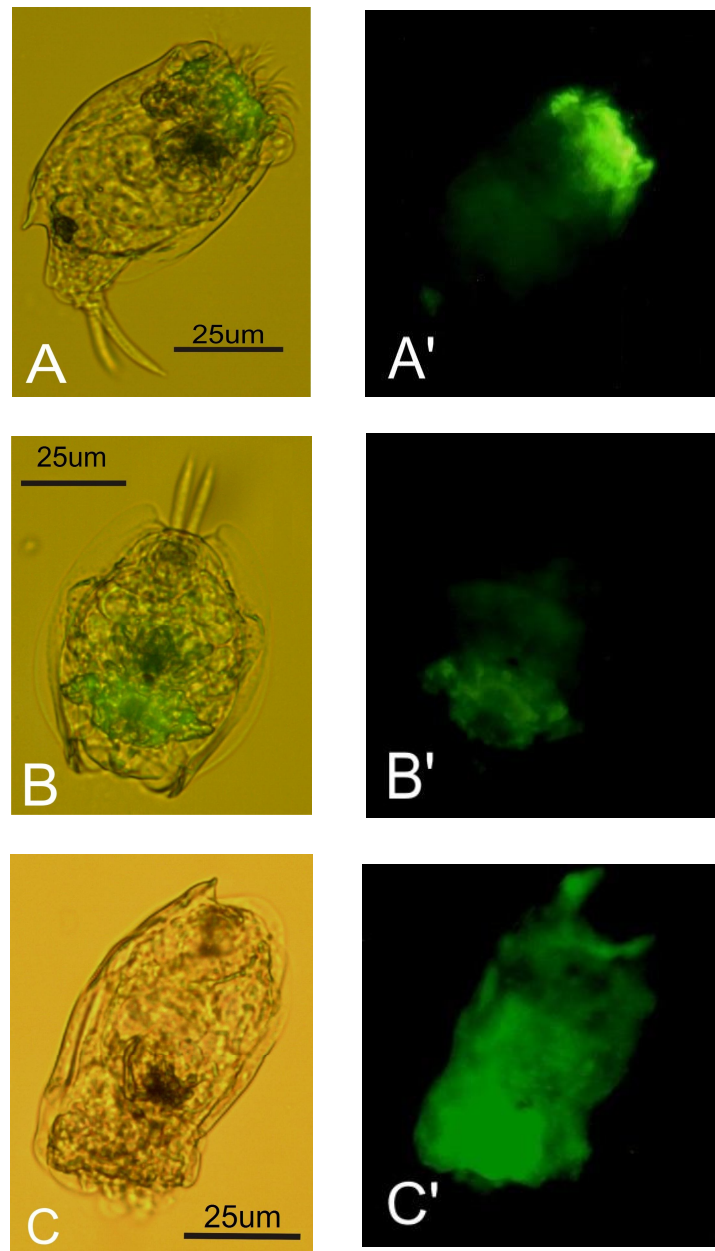


Figura 8. Localización de fluorescencia en neonatos de *E. dilatata* expuestos a concentraciones subletales durante 30 minutos. (A, A') DDT-esterasas en corona. (B, B') Paratión metílico-fosfolipasas A2 en mástax. (C, C') Mercurio-esterasas en todo el cuerpo.

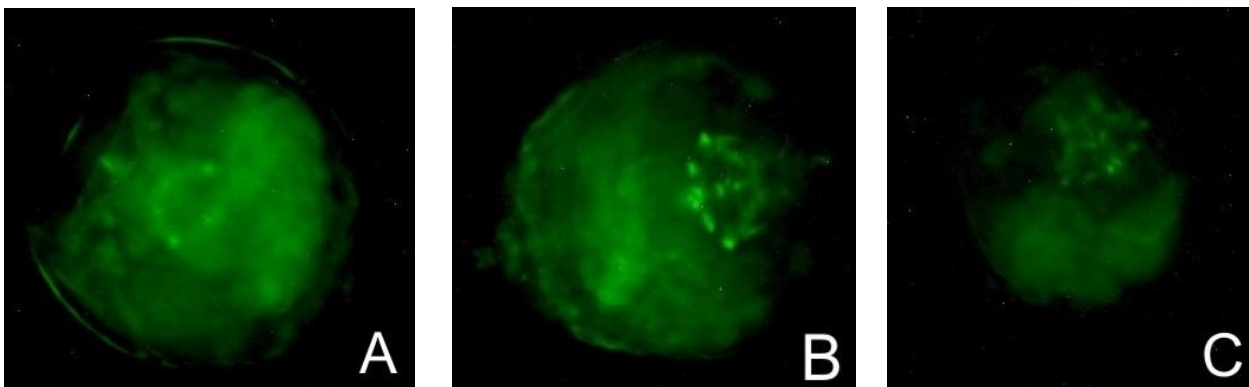


Figura 9. Actividad de esterasas en neonatos de *E. dilatata* expuestos a concentraciones de cadmio donde se detectan los valores CNOE y CMOE. (A) Organismo control. (B) CNOE, $0.1 \mu\text{gL}^{-1}$. (C) CMOE, $0.5 \mu\text{gL}^{-1}$.

Los valores de CE_{50} se estimaron entre 7.9×10^{-7} y $61.9 \mu\text{gL}^{-1}$ con coeficientes de determinación entre 0.75 y 0.96. Los datos indican mayor inhibición de las esterasas cuando se presenta exposición al pesticida DDT en relación a los metales y al paratión metílico, observándose el mismo orden de sensibilidad encontrado en las pruebas de toxicidad aguda ($\text{DDT} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{HgCl}_2 > \text{Paratión metílico}$). Los valores CMOE señalan un efecto adverso sobre la actividad enzimática que se manifiesta a concentraciones muy bajas, lo cual indica alta sensibilidad de las esterasas en la cepa de *E. dilatata* para los tóxicos evaluados. Comparando los valores CMOE y CE_{50} , se observa que el efecto inhibitorio del cadmio sobre el 50% de la actividad enzimática aparece a una concentración 11 veces mayor, lo cual sugiere una baja competencia iónica del metal con cofactores enzimáticos. Por el contrario, el efecto de inactivación esterásica del paratión metílico aparece a una concentración 3.3 veces mayor al valor CMOE, sugiriendo que el pesticida actúa en forma más tardía sobre los organismos de prueba pero de manera más determinante (efecto inhibitorio más inmediato). Para plomo, mercurio y DDT la proporción CE_{50}/CMOE es de 4.2, 4.8 y 7.9, respectivamente, indicando probablemente un mecanismo de acción más efectivo frente al cadmio, con una manifestación más rápida de los efectos inhibitorios una vez se alcanza el umbral de la concentración CMOE. La Figura 10 muestra el análisis de regresión lineal para la estimación del valor de CE_{50} del sistema enzimático de esterasas, de acuerdo con la exposición de *E. dilatata* a concentraciones nominales subletales de cada tóxico. Para el DDT, fue necesario realizar una transformación logarítmica (\log_{10}) a los bajos valores de las concentraciones de exposición, para lograr una mejor representación de la curva.

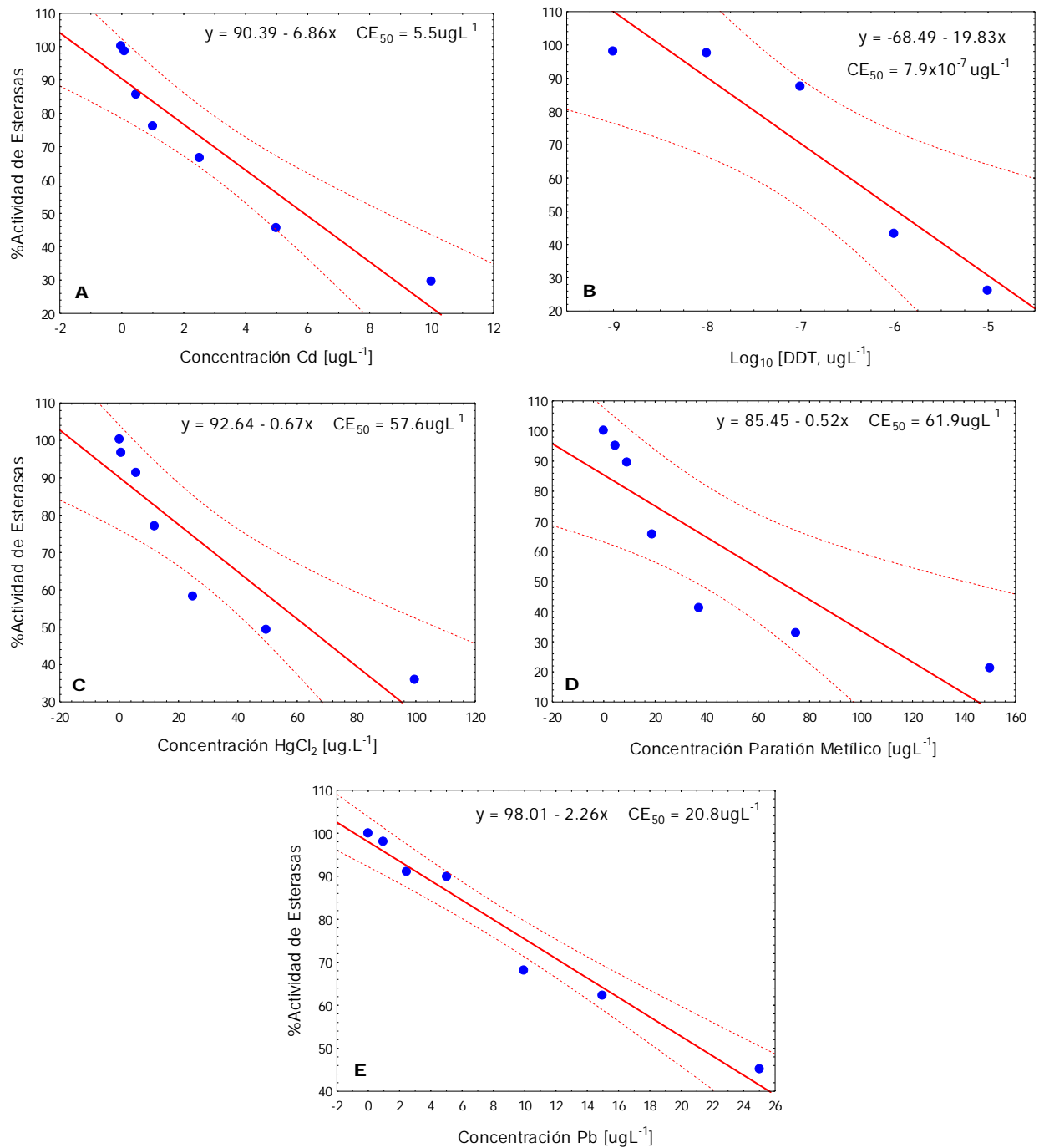


Figura 10. Inhibición de esterasas en neonatos de *E. dilatata* por exposición a concentraciones subletales. (A) Cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Concentración de tóxico ($\mu g L^{-1}$) vs. %Actividad enzimática para 3 réplicas.

La Figura 11 muestra la disminución de la fluorescencia del sustrato fluorescente PLA2 una vez hidrolizado por enzimas fosfolipasas A2 durante 15 minutos en hembras neonatas de *E. dilatata* después de 30 minutos de exposición al plomo. En la Tabla 8 se presentan los resultados de la inactivación de este biomarcador de efecto y en la Figura 12 se presenta el análisis de regresión lineal para la estimación del valor de CE_{50} por exposición a las concentraciones nominales subletales de cada tóxico.

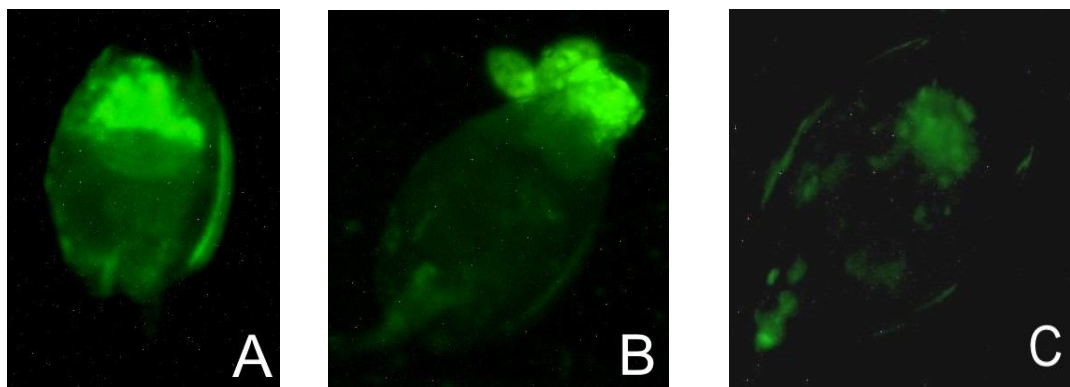


Figura 11. Actividad de fosfolipasas A2 en neonatos de *E. dilatata* expuestos a concentraciones de plomo donde se muestran los valores CNOE y CMOE. (A) Individuo control. (B) CNOE, $1.0 \mu\text{gL}^{-1}$. (C) CMOE, $2.5 \mu\text{gL}^{-1}$.

Tabla 8. Valores de nivel de efecto de metales y pesticidas en neonatos de *E. dilatata* durante pruebas de toxicidad subletal de inhibición *in vivo* de **fosfolipasas A2**. Todas las concentraciones en μgL^{-1} .

Compuesto	CNOE	CMOE	CE_{50}	LC95%	CV (%)	r^2
Cadmio	0.5	1.0	7.6	5.4 – 9.7	9.4	0.91
DDT	1×10^{-7}	1×10^{-6}	0.96×10^{-6}	4.63×10^{-8} – 1.98×10^{-5}	30.4	0.84
Mercurio	0.1	1.0	44.9	18.9 – 70.9	3.2	0.72
Paratión Metílico	9.4	18.7	69.2	41.9 – 96.5	29.1	0.83
Plomo	1.0	2.5	14.1	8.7 – 18.5	41.9	0.84

CNOE = Concentración donde No se Observan Efectos significativos respecto al control.

CMOE = Concentración Mínima donde se Observan Efectos significativos respecto al control.

CE_{50} = Concentración donde se observa un Efecto significativo sobre el 50% del parámetro valorado (inhibición de la actividad de fosfolipasas A2).

LC95% = Límites de Confianza al 95% para el valor de CE_{50} .

CV = Coeficiente de variación entre réplicas ($n = 3$) de los tratamientos para la estimación del valor CE_{50} .

r^2 = Coeficiente de determinación.

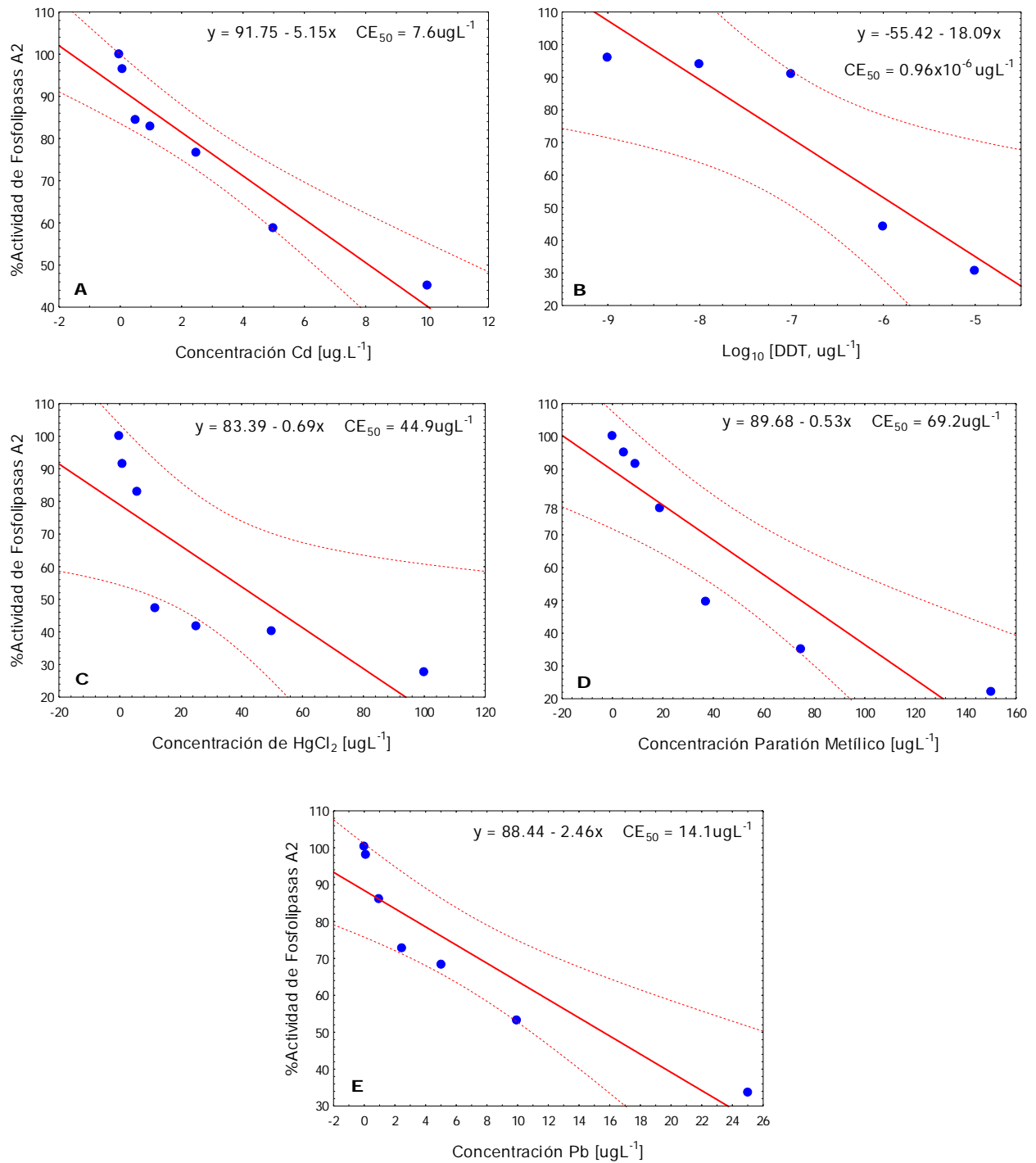


Figura 12. Inhibición de fosfolipasas A2 en neonatos de *E. dilatata* por exposición a concentraciones subletales durante 30 minutos. (A) Cadmio. (B) DDT. (C) Cloruro de mercurio. (D) Paratión metílico. (E) Plomo. Concentración de tóxico ($\mu\text{g L}^{-1}$) vs. %Actividad enzimática para 3 réplicas.

Para este sistema enzimático, se obtiene una respuesta toxicológica similar a las esterasas, con un efecto inhibitorio a partir de concentraciones bajas. En el caso del DDT, el efecto real sobre el 50% de los individuos se alcanza a una concentración 0.96 veces el valor de CMOE, lo cual sugiere un efecto subletal mínimo (o inexistente), siendo la muerte de los individuos el efecto más significativo a la exposición al DDT. Para el paratión metílico, el plomo y el cadmio, la relación entre CE_{50} y CMOE es de 3.7, 5.6 y 7.6, lo que indica el inicio de efectos inhibitorios en forma más tardía. Lo anterior podría indicar que las fosfolipasas A2 tendrían poco valor como biomarcadores de efecto ante exposiciones subletales de los tóxicos señalados. Por el contrario, la relación para el mercurio (44.9) señala la rápida aparición de efectos de inhibición, con concentraciones inferiores a los umbrales encontrados para plomo y paratión metílico. Esto señala a las fosfolipasas A2 como buenos biomarcadores de efecto en la cepa de *E. dilatata* por exposición a mercurio.

8. DISCUSIÓN

8.1 Pruebas de toxicidad letal

Aunque diversas investigaciones han utilizado el valor de CL_{50} en rotíferos para cuantificar los efectos de pesticidas y metales (Gama-Flores *et al.*, 2004), existe poca información sobre pruebas de mortalidad a 48 horas con neonatos menores de 24 horas obtenidos de huevos partenogénéticos. Sin embargo, algunos análisis comparativos pueden llevarse a cabo, pero considerando que son valores de CL_{50} obtenidos en pruebas estandarizadas de 24 horas con neonatos eclosionados de quistes, especialmente de *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* (Snell y Janssen, 1995). En este estudio, la respuesta aguda a 48 horas de exposición de *E. dilatata* varió considerablemente, con valores de CL_{50} que cubren más de 6 órdenes de magnitud. El rango de sensibilidades osciló de $2.69 \times 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el DDT a $607.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el paratión metílico. Así, la concentración letal media de *E. dilatata* generalmente resultó ser más baja comparada con otras especies de invertebrados para los mismos compuestos. Por ejemplo, el valor de CL_{50} para cadmio de *E. dilatata* ($0.0186 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es más bajo que su equivalente para *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* que oscila entre 0.8 y $1.3 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y entre 39.0 y $56.8 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Snell y Janssen, 1995). Una mayor sensibilidad de *E. dilatata* también se observa con otras especies como *B. patulus*, $0.09 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sarma *et al.*, 2000), *B. macracanthus*, $0.19 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nandini *et al.*, 2007) y *B. havanaensis*, $0.41 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Juárez-Franco *et al.*, 2007). En el caso del plomo, *B. plicatilis* y *B. calyciflorus* con un $CL_{50} > 4.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Snell y Janssen, 1995) y *B. patulus* con un CL_{50} de $6.15 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (García-García *et al.*, 2007), son menos sensibles que el correspondiente valor para la cepa de *E. dilatata* ($0.039 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

McDaniel y Snell (1999) estimaron un valor CL_{50} de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cadmio en pruebas agudas de 24 horas con *E. dilatata*. El valor obtenido en este estudio fue 1.8 veces mayor al estimado por los autores mencionados. Aunque ambos protocolos usaron estándares de absorción atómica de este metal, la diferencia puede atribuirse a la sensibilidad propia de cada cepa, el tiempo de exposición y a la edad de los organismos de prueba. Mientras McDaniel y Snell (1999) utilizaron hembras pequeñas no portadoras de huevos, en este estudio se emplearon neonatos menores de 24 horas con 48 horas de exposición al tóxico. Respecto a otras especies utilizadas por los mencionados autores, la cepa de *E. dilatata* utilizada en el presente estudio muestra una sensibilidad mayor al cadmio que oscila entre 1.7 y 15 veces (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de valores de CL₅₀ (µgL⁻¹) para cadmio entre la cepa del rotífero *E. dilatata* utilizada en este estudio de 48 horas y otras especies reportadas por McDaniel y Snell (1999) para un tiempo de exposición de 24 horas.

Especie	CL ₅₀	CL ₅₀ /CL ₅₀	Referencia
<i>Euchlanis dilatata</i>	18	--	Este estudio, 48horas
<i>Asplanchna girodi</i>	130	7.2	
<i>Brachionus calyciflorus</i>	270	15	
<i>Keratella cochlearis</i>	41	2.2	
<i>Lecane quadridentata</i>	46	2.5	McDaniel y Snell
<i>Lepadella patella</i>	62	3.4	(1999), 24 horas
<i>Philodina acuticornis</i>	267	14.8	
<i>Plationus patulus</i>	130	7.2	
<i>Trichocerca pusilla</i>	30	1.7	

Así mismo, *E. dilatata* es muy sensible a los efectos tóxicos de los metales evaluados, en un rango que varía desde 2.4 hasta 94.8 veces (Tabla 10), al ser comparada con tres especies del género *Lecane* (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001). Esto sugiere la variación interespecífica en la sensibilidad a ciertos tóxicos, aún entre organismos que comparten un mismo tipo de hábitat como los sedimentos y zonas litorales de los ambientes acuáticos (Scholten *et al.*, 2005). Igualmente, el valor de CL₅₀ para cadmio en el cladóceros *Moina macrocopa* (Mangas-Ramírez *et al.*, 2004), indica una mayor sensibilidad de la cepa de *E. dilatata*. Respecto al mercurio, *E. dilatata* presenta una sensibilidad aguda intermedia. Especies como *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* tienen valores de CL₅₀ alrededor de 0.06mgL⁻¹ (Snell y Janssen, 1995), mientras rotíferos como *L. quadridentata* o *L. hamata* son 2.4 y 8.3 veces menos sensibles que nuestra especie de prueba. Sin embargo, la información presentada aquí no se ajusta a lo propuesto por Gaona (2004) respecto a que concentraciones entre 1.0 y 10µgL⁻¹ de mercurio ocasionan toxicidad aguda para la mayoría de las poblaciones silvestres en las etapas más sensibles de su desarrollo, condición muy lejana del valor estimado para la cepa de *E. dilatata* pero muy próxima para *D. magna*.

Tabla 10. Comparación de valores de CL₅₀ (µg·L⁻¹) entre diferentes especies de rotíferos y cladóceros por exposición a cadmio, mercurio y plomo.

Especie	CL ₅₀			Sensibilidad relativa de <i>E. dilatata</i>			Referencia
	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	
<i>E. dilatata</i>	18	164	39	-	-	-	Este estudio
<i>L. luna</i>	350	450	140	19.4	2.7	3.5	Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001
<i>L. quadridentata</i>	280	400	3700	15.5	2.4	94.8	
<i>L. hamata</i>	230	1370	680	12.7	8.3	17.4	
<i>B. calyciflorus</i>	-	60	-	-	0.36	-	Snell y Janssen, 1995
<i>M. macrocopa</i>	680	-	-	37.7	-	-	Mangas-Ramírez <i>et al.</i> , 2004
<i>D. magna</i>	130	12	190	7.2	0.07	4.8	Palacio, 2007

D. magna es un cladóceros recomendado como organismo de prueba en la legislación mexicana (NMX-AA-087-1995-SCFI). Sin embargo, nunca ha sido reportado en forma natural en México, por lo cual no puede ser considerado un representante ecológico del país (Martínez-Jerónimo y Muñoz-Mejía, 2007). Esto obedece principalmente a que la mayoría de los cuerpos de agua en México se encuentran en la zona tropical y subtropical donde experimentan una temperatura media anual de 25°C y las pruebas con *D. magna* se desarrollan a temperaturas más bajas (15-20°C), no reflejando las condiciones reales de los ambientes naturales mexicanos (Juárez-Franco *et al.*, 2007). Al comparar la susceptibilidad al cadmio entre la cepa de *E. dilatata* y cepas de *D. magna* y *D. pulex* (Rico *et al.*, 2001), el rotífero es alrededor de 10 veces más susceptible a los efectos letales de este metal en relación a estos cladóceros. Sin embargo, una cepa de *Simocephalus vetulus* estudiada por los mismos autores, reveló un nivel de sensibilidad comparable (0.03mg·L⁻¹) con la de *E. dilatata* obtenida en este estudio (0.02mg·L⁻¹). De acuerdo con Palacio (2007), *D. magna* también resulta menos sensible que *E. dilatata* para el cadmio y el plomo, pero no en el caso del mercurio (Tabla 10). Para este metal, *D. magna* tiene un valor CL₅₀ de 12µg·L⁻¹ en 24 horas de exposición, resultado inferior al establecido para *E. dilatata* (164.2µg·L⁻¹). Esto confirma los reportes que describen a *D. magna* como el organismo de prueba más sensible a los efectos tóxicos del mercurio (Atici *et al.*, 2008).

El valor de CL₅₀ para paratión metílico resultó más bajo que el reportado para *B. calyciflorus* (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1992) o *B. plicatilis*, en pruebas agudas de 24 horas (Tabla 11). En el caso de las especies salinas, su capacidad de osmorregulación les confiere una mayor resistencia a los efectos tóxicos de los organofosforados, lo que explica su menor sensibilidad (Guzzella *et al.*, 1997). Igualmente, pruebas agudas de 24 horas con *B. patulus* señalan valores de CL₅₀ entre 8.8 y 10.7mgL⁻¹, según la densidad de alimento (Sarma *et al.*, 2001), valores que siguen indicando la mayor sensibilidad de la cepa de *E. dilatata* al paratión metílico. Finalmente, Pérez-Legaspi *et al.* (2010) reporta un valor de CL₅₀ para *L. quadridentata* a 48 horas que es 15.6 mayor al estimado para la cepa de *E. dilatata*. Aunque *E. dilatata* tiene una sensibilidad similar con *B. angularis* (Tabla 11), los resultados anteriores indican que nuestro organismo de prueba es más sensible al pesticida que otras especies de rotíferos con las cuales es comparado.

Tabla 11. Comparación de valores de CL₅₀ (µgL⁻¹) entre diferentes especies de rotíferos y cladóceros por exposición a paratión metílico.

Especie	CL ₅₀	Sensibilidad relativa de <i>E. dilatata</i>	Referencia
<i>E. dilatata</i>	607	-	Este estudio
<i>B. calyciflorus</i>	29900	49.2	Fernández-Casalderrey <i>et al.</i> , 1993
<i>B. plicatilis</i>	> 67000	110.4	Guzzella <i>et al.</i> , 1997
<i>B. patulus</i>	8800	14.5	Sarma <i>et al.</i> , 2001
<i>B. angularis</i>	636	1.05	Gama-Flores <i>et al.</i> , 2004
<i>L. quadridentata</i>	9500	15.6	Pérez-Legaspi <i>et al.</i> , 2010
<i>M. macrocopa</i>	50	0.08	Mangas-Ramírez <i>et al.</i> , 2004
<i>Simocephalus</i> sp.	0.37	6.0x10 ⁻²	Mangas-Ramírez <i>et al.</i> , 2004
<i>D. magna</i>	12.3	0.02	US EPA, 2000

En contraste, el valor de CL₅₀ indica un menor efecto del paratión metílico sobre *E. dilatata* respecto al observado en algunos cladóceros (Tabla 11). Por ejemplo, para *D. magna* se reporta un intervalo de toxicidad entre 7.3 y 12.3µgL⁻¹ en pruebas agudas de 48 horas de exposición (US EPA, 2000). Igualmente, para *Simocephalus* sp. y *Moina macrocopa* se estiman valores de CL₅₀ por exposición de 24 horas a este pesticida (Mangas-Ramírez *et al.*, 2004) que resultan más sensibles que nuestra especie de prueba. Posiblemente, la sensibilidad intermedia mostrada por *E. dilatata* al paratión

metílico estaría relacionada con la influencia que ejercen factores ambientales sobre los efectos tóxicos como la temperatura o la disponibilidad de alimento (Gama-Flores *et al.*, 2004), además de confirmar que los pesticidas organofosforados afectan en forma letal al zooplankton durante periodos cortos de exposición, aún si sus concentraciones son menores a 1.0mgL^{-1} (Sakai, 2006).

Los reportes de toxicidad aguda del DDT sobre especies de rotíferos son pocos. Rao y Sarma (1986) encontraron que concentraciones subletales de DDT ejercían un efecto importante sobre la mortalidad en estados iniciales del rotífero *B. patulus*. A partir de 45 y $60\mu\text{gL}^{-1}$, los efectos del DDT sobre la tasa intrínseca de crecimiento y la expectativa de vida después de 48 de exposición fueron evidentes, sugiriendo que los individuos más jóvenes son más susceptibles al estrés tóxico del pesticida y probablemente destinados a morir. Aunque en concentraciones inferiores a las analizadas por Rao y Sarma (1986), las pruebas agudas con la cepa de *E. dilatata* presentaron la misma tendencia de un incremento proporcional entre concentración de DDT y mortalidad para el mismo tiempo de exposición. Otros estudios muestran que el cladóceros *D. magna* presenta una sensibilidad aguda al DDT entre $3.01\mu\text{gL}^{-1}$ (Ziegenfuss *et al.*, 1986) y $8.62\mu\text{gL}^{-1}$ (Mejía-Saavedra *et al.*, 2005), mientras *D. pulex* presenta un valor de CL_{50} de $0.36\mu\text{gL}^{-1}$ en pruebas agudas de 48 horas (OMS, 1989). Por su parte, el rotífero *L. quadridentata* reporta una resistencia extremadamente alta frente al DDT con un CL_{50} superior a $490\mu\text{gL}^{-1}$ (Mejía-Saavedra *et al.*, 2005). A pesar de esto, la susceptibilidad al DDT es mucho mayor en *E. dilatata* en relación a estos organismos, lo cual difiere significativamente de la tendencia general observada en los rotíferos de presentar una baja sensibilidad a los compuestos orgánicos (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001; Marcial *et al.*, 2005). Una posible razón de la disminución a la tolerancia al DDT podría ser un incremento en los metabolitos DDD y DDE de este pesticida en los pocillos de exposición. A pesar de que estos metabolitos pueden alcanzar una toxicidad más baja que su compuesto parental, resultan ser compuestos más polares facilitando su mayor hidrosolubilidad (Kashiwada *et al.*, 2002) y biodisponibilidad para los neonatos en exposición y los efectos adversos observados. Además, no se descartan errores humanos durante el proceso de preparación y ejecución de las pruebas de toxicidad agudas y subletales con ese pesticida.

Aunque los valores de CL_{50} son estimados sin alimento disponible para los organismos de prueba debido a la mitigación de la toxicidad de los compuestos (Hernández-Flores y Rico-Martínez, 2006), la evaluación de la respuesta de *E. dilatata* bajo esta condición permitiría confrontar la alta sensibilidad mostrada por esta cepa

frente a los tóxicos evaluados. Por ejemplo, Gama-Flores (2001) demostró que la presencia de algas como *Chorella vulgaris* en pruebas toxicológicas con *E. dilatata* reduce los efectos tóxicos del paratión metílico.

8.2 Pruebas de toxicidad subletal

La toxicidad de metales y pesticidas en el medio acuático ha sido evaluada con el monitoreo de sus concentraciones ambientales o con el desarrollo de ensayos que utilizan diversos biomarcadores, en especial de tipo enzimático (Kawakami *et al.*, 2008). En este estudio, las pruebas toxicológicas subletales permitieron observar una actividad enzimática localizada principalmente en la corona y en el mástax de los neonatos (Figura 8), además de que el efecto inhibitorio de ambos sistemas enzimáticos se presentó con la exposición a concentraciones muy bajas de los tóxicos evaluados. Los valores de CE_{50} señalan que la mayor inhibición de las fosfolipasas A2 se presenta con el plomo y el mercurio, mientras el efecto de inactivación para las esterasas se observa con el cadmio y el paratión metílico. Sin embargo, la relación entre el valor promedio de CE_{50} de los compuestos orgánicos y su equivalente para metales (esterasas: 1.05; fosfolipasas A2: 1.55), parecería indicar que el efecto de inhibición es el mismo o muy similar para ambos grupos de tóxicos. Esto se explica por el amplio intervalo observado del valor de CE_{50} entre los pesticidas y el estrecho margen establecido entre los metales.

La estimación de una concentración de efecto (CE_{50}) respecto a la inhibición del 50% de la actividad enzimática, sugiere un efecto subletal significativo para la cepa de prueba por exposición a metales y pesticidas. Aunque este resultado es importante, su comparación con el efecto agudo evaluado muestra un estrecho margen entre concentraciones de efecto (Tabla 12), lo cual sugiere que la muerte de los organismos es el efecto más relevante en la cepa de *E. dilatata*. En consecuencia de lo anterior, los sistemas enzimáticos estudiados no podrían ser considerados, en principio, como buenos biomarcadores de efecto en la evaluación de toxicidad subletal de cadmio, mercurio y plomo en la especie de prueba. Por ejemplo, para *E. dilatata* expuesto a mercurio con una relación CL_{50}/CE_{50} de 2.8 (Tabla 12), las esterasas serían inhibidas un 50% a una concentración tan solo 2.8 veces más baja que la requerida para matar a la mitad de los individuos de esta cepa de prueba. Este hallazgo contrasta con los resultados de Pérez-Legaspi *et al.* (2002) en relación a que las esterasas son buenos

biomarcadores de efecto de estos metales en tres especies de *Lecane*, encontrando valores para la proporción mencionada hasta de 400000 para *Lecane luna* expuesta a mercurio. Sin embargo, al comparar el intervalo de valores de CL₅₀/CE₅₀ encontrado en la cepa de *E. dilatata* para los tres metales (1.8 a 3.4), se observa un buen ajuste con el intervalo establecido para *L. quadridentata* (0.54 a 61.6) para los mismos tóxicos.

Tabla 12. Comparación de los valores de CL₅₀ y de CE₅₀ (µgL⁻¹) para cinco tóxicos y dos sistemas enzimáticos evaluados en neonatos de *E. dilatata*. CL₅₀: Concentración Letal Media. CE_{50E}: Concentración de Efecto Medio para Esterasas. CE_{50PLA2}: Concentración de Efecto Medio para Fosfolipasas A2.

Tóxico	CL ₅₀	CE _{50E}	CE _{50PLA2}	CL ₅₀	CL ₅₀
				CE _{50E}	CE _{50PLA2}
Cadmio	18.6	5.5	7.6	3.4	2.4
DDT	2.67x10 ⁻⁴	7.9x10 ⁻⁷	0.96x10 ⁻⁶	337.9	278.1
Mercurio	164.2	57.6	44.9	2.8	3.6
Paratión Metílico	607.1	61.9	69.2	9.8	8.7
Plomo	38.5	20.8	14.1	1.8	2.7

La comparación del efecto de inhibición del 50% en la actividad de esterasas entre nuestro organismo de prueba y tres especies de *Lecane* (Tabla 13) indica que la cepa de *E. dilatata* es más sensible que *L. quadridentata* para los metales examinados. Respecto al mercurio, *E. dilatata* resulta muy poco sensible en relación a *L. luna*, pero muestra una sensibilidad 7 veces mayor respecto a *L. hamata*.

Tabla 13. Comparación de valores de CE₅₀ (µgL⁻¹) de inhibición de esterasas entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.

Especie	CE ₅₀			Sensibilidad relativa de <i>E. dilatata</i>			Referencia
	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	
	<i>E. dilatata</i>	5.5	57.6	20.8	--	--	
<i>L. luna</i>	502	1x10 ⁻³	--	91.3	1.7x10 ⁻⁵	--	Pérez-Legaspi <i>et al.</i> , 2002
<i>L. quadridentata</i>	190	730	60	34.5	12.6	2.9	
<i>L. hamata</i>	--	400	--	--	7.0	--	

Resulta también interesante la comparación de la relación de toxicidad aguda y el parámetro de toxicidad subletal CNOE para esterazas. Para el cadmio, la razón $CL_{50}/CNOE$ en *E. dilatata* toma un valor de 180 el cual se encuentra fuera del rango de 2.8 a 70 establecido para las tres especies de *Lecane* (Pérez-Legaspi *et al.*, 2002) y es bastante diferente del valor de 52 reportado por Burbank y Snell (1994) en *B. calyciflorus*. Para el mercurio, las especies de *Lecane* tienen valores que oscilan entre 4.0 y 4.5×10^9 , lo cual se compara bien con el valor de 27.3 encontrado con nuestra cepa de prueba. Sin embargo, el valor de 120 encontrado para *B. calyciflorus* muestra una diferencia de sensibilidad mayor respecto a la cepa de *E. dilatata*. Respecto al plomo, el valor con *E. dilatata* de 15.6 es bastante diferente del valor de 370 reportado para *L. quadridentata* por Pérez-Legaspi *et al.* (2002). Una respuesta diferente de inhibición ocurre con los compuestos orgánicos, ya que la relación $CL_{50}/CNOE$ oscilan entre 67.6 y 26700. Estos resultados indican umbrales de sensibilidad muy amplios y diferentes para cada tóxico, lo cual estaría favoreciendo la detección temprana de efectos adversos sobre parámetros ecológicamente relevantes, como la supervivencia o la reproducción de la cepa en estudio.

La comparación del valor de CE_{50} para cadmio entre *E. dilatata* y ocho especies de rotíferos reportados por McDaniel y Snell (1999), señala la mayor sensibilidad de la cepa de prueba respecto a siete de estas especies en un intervalo entre 7.3 y 98.2 (Tabla 14). Solamente el rotífero *Trichocerca pusilla* resultó ser más sensible que *E. dilatata* por exposición subletal al cadmio.

Tabla 14. Comparación de valores de CE_{50} (μgL^{-1}) por inhibición de esterazas de *E. dilatata* con diferentes especies de rotíferos (CE_{50}/CE_{50}) expuestos a concentraciones subletales de cadmio.

Especie	CE_{50}	CE_{50}/CE_{50}	Referencia
<i>E. dilatata</i>	5.5	--	Este estudio
<i>A. girodi</i>	500	90.9	
<i>B. calyciflorus</i>	240	43.6	
<i>K. cochlearis</i>	80	14.5	
<i>L. quadridentata</i>	540	98.2	McDaniel y Snell,
<i>L. patella</i>	40	7.3	1999
<i>P. acuticornis</i>	52	9.5	
<i>P. patulus</i>	50	9.1	
<i>T. pusilla</i>	0.75	0.14	

Respecto a los pesticidas, la información disponible sobre efectos inhibitorios de sistemas enzimáticos es reducida. Existe una investigación donde se analiza el efecto del paratión metílico sobre la actividad enzimática de esterasas en *L. quadridentata* (Pérez-Legaspi *et al.*, 2010), en donde se reporta un valor de CE₅₀ muy superior al valor estimado en la cepa de *E. dilatata* (Tabla 15), lo cual sugiere que la actividad de enzimas esterasas es un mejor biomarcador de efecto por exposición al paratión metílico en *E. dilatata* que en *L. quadridentata*. La relación CL₅₀/CE₅₀ ayuda a reforzar este resultado (Tabla 16). Mientras en *L. quadridentata* la concentración de pesticida que causa un efecto inhibitorio del 50% de la actividad esterásica es prácticamente el mismo valor requerido para ocasionar la muerte a la mitad de la población (1.01), en *E. dilatata* dicha razón es más amplia (9.8); esto permite la detección rápida y sensible de alteraciones bioquímicas antes de que se presenten efectos agudos sobre la cepa de *E. dilatata* y probablemente en otros organismos acuáticos.

Tabla 15. Comparación de valores CL₅₀ y CE₅₀ (µgL⁻¹) entre varios invertebrados acuáticos expuestos a concentraciones subletales de paratión metílico. Los valores corresponden a concentraciones de inhibición de esterasas en *E. dilatata* y *L. quadridentata* y de la tasa de filtración de alimento en *B. calyciflorus* y *D. magna*.

Especie	CL ₅₀	CE ₅₀	CL ₅₀ /CE ₅₀	Referencia
<i>E. dilatata</i>	607.1	61.9	9.8	Este estudio
<i>L. quadridentata</i>	9500	9400	1.01	Pérez-Legaspi <i>et al.</i> , 2010
<i>B. calyciflorus</i>	29900	5570	5.4	Fernández-Casalderrey <i>et al.</i> , 1993
<i>D. magna</i>	12.3	7.5x10 ⁻⁵	164000	<i>al.</i> , 1993

De igual manera, Fernández-Casalderrey *et al.* (1993) estiman los valores de CE₅₀ para la tasa de filtración de alimento (*Nannochloris oculata*) en *B. calyciflorus* y *D. magna* durante 5 horas de exposición a concentraciones subletales de paratión metílico (Tabla 15). Comparativamente, la sensibilidad de *E. dilatata* a este mismo compuesto se halla en un valor medio, siendo más sensible que *B. calyciflorus* y más tolerante que el cladóceros. Aunque se evalúan dos procesos diferentes (bioquímico y fisiológico), los resultados sugieren que la inhibición de enzimas resulta un biomarcador de efecto más sensible a la exposición subletal del paratión metílico que la tasa de filtración de alimento. Además de esta sensibilidad, la inactivación enzimática es favorecida por un menor tiempo requerido para su evaluación (30 minutos).

Las diferencias en la respuesta enzimática podrían estar relacionadas con el tipo de mecanismo de acción que presenta cada tipo de tóxico. Aunque metales y pesticidas afectan el sistema de transmisión de impulsos nerviosos, diferencias en el sitio blanco de acción tóxica (canales iónicos axonales, sitio activo enzimático, fosfolípidos de membrana), pudieran derivar en la pérdida parcial o total de la capacidad catalítica o de la función neuromuscular de los organismos (Castro *et al.*, 2004), lo cual, probablemente, conduciría a una variabilidad en la sensibilidad a los tóxicos. En el mismo sentido, tales diferencias pueden deberse a que las esterasas presentan un polimorfismo genético y molecular y sus distribuciones y funciones fisiológicas difieren entre especies (Massoullie *et al.*, 1993). Por tanto, los resultados con la cepa de *E. dilatata* sugieren que el grado de inhibición enzimática es ligera o fuertemente inhibida según el tipo de tóxico.

La inhibición *in vivo* de las fosfolipasas A2 sugiere una mayor sensibilidad al plomo y al mercurio (Tabla 12). Al comparar los resultados de *L. luna* como la especie más susceptible a cuatro metales (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003), se observa una sensibilidad muy similar a la cepa de *E. dilatata* en la inhibición de fosfolipasas A2. Mientras *L. luna* presenta valores de CMOE que oscilan entre 0.01 y 75 μgL^{-1} y de 53 a 920 μgL^{-1} para valores de CE_{50} (Tabla 16), las concentraciones para la especie de prueba se encuentran entre 1.0 y 2.5 μgL^{-1} y entre 7.6 y 44.9 μgL^{-1} , respectivamente. Por su parte, la actividad de las fosfolipasas A2 en *L. hamata* es menos inhibida por los tres metales respecto a la cepa de *E. dilatata*. La sensibilidad más cercana de nuestra cepa de prueba, se observa para el mercurio con *L. luna* y *L. quadridentata*.

Tabla 16. Comparación de valores CE_{50} (μgL^{-1}) de inhibición de fosfolipasas A2 entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.

Especie	CE_{50}			Sensibilidad relativa de <i>E. dilatata</i>			Referencia
	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	
<i>E. dilatata</i>	7.6	44.9	14.1	--	--	--	Este estudio
<i>L. luna</i>	191	53	920	25.1	1.2	65.2	Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003
<i>L. quadridentata</i>	180	58	1150	23.7	1.3	81.5	
<i>L. hamata</i>	5130	5520	10600	675	122.9	751.7	

La comparación de los valores CNOE (Tabla 17) indica que la cepa de *E. dilatata* presenta un amplio intervalo de concentraciones donde no existe un efecto adverso sobre los organismos (10-2000) para los metales evaluados. Solamente la exposición subletal a mercurio, ocasiona un mismo grado de sensibilidad entre *L. quadridentata*, *L. luna* y *E. dilatata*. De acuerdo con los reportes de Burbank y Snell (1994) y Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2003), las fosfolipasas A2 fueron menos sensibles que las esterasas, particularmente con cadmio y mercurio. Sin embargo, esta tendencia se aplica parcialmente con la cepa de *E. dilatata* ya que las fosfolipasas A2 resultan más sensibles para el mercurio y plomo que las esterasas.

Tabla 17. Comparación de valores CNOE (μgL^{-1}) de inhibición de fosfolipasas A2 entre diferentes especies de rotíferos por exposición subletal a cadmio, mercurio y plomo.

Especie	CNOE			Sensibilidad relativa de <i>E. dilatata</i>			Referencia
	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg	Pb	
<i>E. dilatata</i>	0.1	0.1	1.0	--	--	--	Este estudio
<i>B. calyciflorus</i>	50	20	--	500	200	--	Burbank y Snell, 1994
<i>L. luna</i>	50	0.1	50	500	1	50	Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003
<i>L. quadridentata</i>	200	0.1	500	2000	1	500	
<i>L. hamata</i>	15	25	10	150	250	10	

La inhibición de enzimas fosfolipasas A2 en el rotífero *L. quadridentata* por exposición a DDT, indican una sensibilidad de $38.5\mu\text{gL}^{-1}$ (Mejía-Saavedra *et al.*, 2005) nivel que sigue siendo 40000 veces menor a la sensibilidad estimada para la cepa de *E. dilatata*. Rao y Sarma (1986), estudiando el efecto de concentraciones subletales de DDT y disponibilidad de alimento (*Chlorella* sp.) sobre parámetros reproductivos de *B. patulus*, encontraron una alta interacción DDT-alimento y la disminución de la supervivencia de los rotíferos a partir de $30\mu\text{gL}^{-1}$ del pesticida. Parámetros como la tasa de crecimiento y la expectativa de vida de neonatos, muestran valores de CE_{50} de 16.2 y $32.5\mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente, los cuales son superiores a las concentraciones estimadas en la cepa de *E. dilatata* por inhibición de la actividad enzimática. Aunque se trata de procesos distintos (reproductivo y bioquímico), se encuentra que los parámetros evaluados son afectados por niveles más bajos de DDT cuando la concentración de alimento es baja, y más aún cuando no está disponible como en

nuestro caso. De la misma forma, la respuesta de organismos crónicamente expuestos (16 días) respecto a la exposición subletal (30 min) al DDT, sugiere que la interacción inicial tóxico-sitio blanco (enzima) tiene un efecto sistemático mayor que los efectos reproductivos. Probablemente las concentraciones del pesticida presentes en las aguas naturales causantes de alteraciones bioquímicas en ciertas especies de rotíferos, sean mucho más bajas que aquellas establecidas durante pruebas de laboratorio para otros parámetros como reproducción, tasas de ingestión o interacciones predador-presa (Rao y Sarma, 1986).

Las diferencias y semejanzas encontradas entre la cepa de *E. dilatata* y otros rotíferos y cladóceros, señalan que la sensibilidad letal y a la inhibición enzimática es particular para cada especie y dependerá del tipo de tóxico y de su mecanismo de acción. Por tanto, la respuesta enzimática mostrada por la cepa de *E. dilatata* ante los tóxicos, particularmente a los pesticidas como grupo, motiva la realización de estudios complementarios que ayuden a dilucidar y explicar mejor la alta sensibilidad observada en esta cepa. Por ejemplo, es posible que diferentes cantidades de enzimas fueran inhibidas durante las pruebas. Aunque los sustratos fluorogénicos usados en este trabajo son específicos para fosfolipasas A2 y esterases, un número heterogéneo de este tipo de enzimas podría estar presente en las especies evaluadas (Kawakami *et al.*, 2008) incluida la cepa de *E. dilatata*. Considerando que cada enzima podría haber respondido en forma diferente al sustrato después de la exposición a los tóxicos, el efecto total dependerá del mecanismo de acción de cada sustancia tóxica (Raimondo *et al.*, 2009) y del número y estado de maduración de cada sistema enzimático presente en los neonatos de *E. dilatata*. Esto señala cierta precaución en la interpretación de resultados como prueba diagnóstica de las causas y los efectos de una sustancia tóxica en particular (Barata *et al.*, 2007).

Es importante comparar las concentraciones ambientales de los xenobióticos evaluados en ecosistemas acuáticos donde la especie de prueba potencialmente estaría presente, particularmente en los sedimentos. Así, concentraciones de mercurio entre 247.51 y 611.2 μgkg^{-1} (Valle, 2006) y de DDT entre 992.6 y 4998.4 μgkg^{-1} se reportan en la fase sedimentaria de algunos ríos de la Huasteca Potosina Sur (Mejía-Saavedra *et al.*, 2005). Otros estudios reportan altas concentraciones de plomo (90 - 130 mgkg^{-1}), mercurio (3.8 - 4.8 mgkg^{-1}) y cadmio (1.2 - 3.0 mgkg^{-1}) en diferentes estaciones de muestreo en el río San Pedro, principal colector de aguas residuales y tratadas del Estado de Aguascalientes, México (Mora, 2007). Nuestras bajas

concentraciones de efecto letal y subletal, y particularmente de los valores CMOE, sugieren que la exposición de la cepa de *E. dilatata* a estas concentraciones ambientales, ocasionaría la muerte de los organismos sin permitir el establecimiento de poblaciones de esta especie. Lo anterior reduce la posibilidad de uso de esta cepa de rotíferos como bioindicador de estrés ambiental y particularmente a las esterasas y fosfolipasas A2 como biomarcadores de efectos tóxicos. Con base en esto, se propone el desarrollo de estudios adicionales de tipo bioquímico y reproductivo que exploren la respuesta de otros sistemas enzimáticos o de crecimiento poblacional, ante exposición de otras sustancias tóxicas (detergentes, fenoles, Mn, Fe, Al, Zn) cuya presencia en altas concentraciones ha sido reportada en zonas aledañas a la cuenca del río San Pedro (Mora, 2007; Torres-Guzmán *et al.*, 2010). Otra alternativa sería analizar la respuesta de diferentes variedades genéticas de *E. dilatata*, intentando establecer una relación entre la respuesta toxicológica y la filogenia de estos organismos, mediante análisis filogenéticos de marcadores moleculares, por ejemplo de tipo mitocondrial como citocromo oxidasa subunidad 1.

La información revisada indicaría un amplio uso de los rotíferos en pruebas toxicológicas. Sin embargo, los datos para análisis comparativos de sensibilidad a compuestos tóxicos en este grupo de organismos está limitada a ciertos géneros o especies, como *B. calyciflorus*, *B. plicatilis* o *L. quadridentata*. Las posibles razones serían el desarrollo de protocolos de cultivo de algunas especies de rotíferos de interés comercial, especialmente para la obtención de quistes y como alimento vivo de otras especies importantes en acuicultura, como peces y camarones. Así mismo, la preferencia por organismos de mayor talla y con una amplia disponibilidad de referencias bibliográficas (i.e., *D. magna*).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos y su análisis comparativo con otros estudios permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- ✚ La sensibilidad mostrada por la cepa de *E. dilatata* utilizada en este estudio, hace de este rotífero un organismo potencial para pruebas toxicológicas debido a su alta sensibilidad a los metales y pesticidas, su facilidad de cultivo, su mayor tamaño respecto a otros rotíferos, su facilidad de manejo durante las pruebas y su presencia en zonas de sedimentos donde los tóxicos generalmente se depositan y se hacen biodisponibles.
- ✚ *E. dilatata* mostró una mayor sensibilidad a los efectos letales de Cd y Pb que otras especies de invertebrados acuáticos utilizados tradicionalmente en las pruebas de toxicidad. Su sensibilidad hacia el cloruro de mercurio y paratión metílico fue moderada y notablemente alta al pesticida DDT en comparación con lo reportado en otras especies de cladóceros y rotíferos.
- ✚ La respuesta de la cepa de *E. dilatata* al DDT no se ajusta a la tendencia general reportada en la literatura en otras especies de rotíferos, de presentar una baja sensibilidad a los compuestos orgánicos. Por lo tanto, se cumple parcialmente la primera parte de la hipótesis de investigación, pues se encontró una sensibilidad letal moderada y comparable con otros rotíferos para el paratión metílico que contrasta con una baja tolerancia de la cepa frente al DDT.
- ✚ La respuesta diferencial en cada sistema enzimático contradice la segunda parte de la hipótesis formulada en relación a que las esterasas son biomarcadores de efecto más sensibles que las fosfolipasas A2 en un amplio rango de susceptibilidad y sustancias tóxicas. Para la cepa de *E. dilatata* se encontró que las esterasas son mejores biomarcadores de efecto por exposición a cadmio y paratión metílico, mientras las fosfolipasas A2 presentan mayor sensibilidad al efecto inhibitorio del plomo y el mercurio. Respecto al DDT, la susceptibilidad de ambos sistemas enzimáticos es prácticamente la misma.

- ✚ A pesar del efecto de inhibición diferencial indicado anteriormente, la respuesta subletal en ambos sistemas enzimáticos mostró el mismo orden de sensibilidad a los diferentes tóxicos observado durante las pruebas agudas: DDT > Cadmio > Plomo > Mercurio > Paratión metílico.
- ✚ Este estudio sugiere que organismos tradicionalmente utilizados en pruebas toxicológicas como *B. calyciflorus* y *D. magna*, no resultan ser especies representativas de una comunidad acuática desde el punto de vista de sensibilidad a diferentes tóxicos. El uso de la actividad enzimática como una herramienta de corto tiempo de evaluación y de cepas de rotíferos como *E. dilatata*, cobran importancia debido a su alta sensibilidad a concentraciones subletales de compuestos tóxicos biodisponibles en los sedimentos y zonas litorales de ambientes acuáticos donde este organismo generalmente habita.

10. RECOMENDACIONES

- ✚ Realizar pruebas toxicológicas complementarias que contribuyan a caracterizar y explicar la alta sensibilidad mostrada por la cepa de prueba de *E. dilatata*. Estas pruebas podrían incluir bioensayos de inhibición de crecimiento que consideren la tasa de crecimiento instantánea (r) como parámetro de valoración, así como el desarrollo de tablas de vida con diferentes niveles de alimento e intervalos de temperatura.
- ✚ Llevar a cabo pruebas toxicológicas con otros pesticidas organoclorados y organofosforados que evidencien la tendencia general mostrada por los compuestos probados en este estudio y que ayuden a esclarecer los mecanismos de acción involucrados.
- ✚ Evaluar la susceptibilidad como biomarcadores de efecto de otros sistemas enzimáticos presentes en rotíferos como las glucosidasas, lactato deshidrogenasa o glutatión S-transferasa, al igual que otros biomarcadores fisiológicos, histológicos (xenobióticos en vitelario), morfológicos (longitud corporal) o conductuales (ingesta/filtración de alimento) de los organismos de prueba.
- ✚ Realizar la valoración de diferencias en la sensibilidad o tolerancia de distintas cepas de *E. dilatata* para México, mediante análisis comparativos de la caracterización toxicológica y molecular de varias cepas clonales de la especie de prueba. Probablemente, estos estudios ayuden a esclarecer si la susceptibilidad mostrada por el cultivo de prueba es una tendencia generalizada para la especie o es un caso particular de exacerbación de la sensibilidad a los tóxicos.

REFERENCIAS

- Albert LA. 2004. Panorama de los Plaguicidas en México. Revista de Toxicología en Línea. (En línea: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>). Acceso: 30 de Agosto de 2010.
- Arias-Almeida JC, Ramírez-Restrepo JJ. 2009. Caracterización preliminar de los sedimentos de un embalse tropical: represa La Fe (El Retiro, Antioquia, Colombia). *Limnetica* 28:65-78.
- Arora J, Mehra NK. 2003. Seasonal dynamics of rotifers in relation to physical and chemicals conditions of the river Yamuna (Delhi), India. *Hydrobiologia* 491:101-109.
- Atici T, Ahiska S, Altindag A, Aydin D. 2008. Ecological effects of some heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) pollution of phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Sariyar Dam Reservoir in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 7:1972-1977.
- Badii MH, Varela S. 2008. Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. *Culcyt* 28:5-17.
- Barata C, Solayan A, Porte C. 2004. Role of β -esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 66:125-139.
- Barata C, Damasio J, López MA, Kuster M, López de Alda M, Barceló D, Riva MC, Raldúa D. 2007. Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:370-379.
- Burbank SE, Snell TW. 1994. Rapid toxicity assessment using esterase biomarkers in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Environmental Toxicology and Water Quality* 9:171-178.
- Burke JE, Dennis EA. 2009. Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 23:49-59.
- Calva LG, Torres MR. 1998. Plaguicidas Organoclorados. *Contactos* 30:35-46.
- Castañé PM, Topalián ML, Cordero R, Salibián A. 2003. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología* 20:13-18.
- Castillo G. (ed.). 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (Canadá) – Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 202p.
- Castro BB, Sobral O, Guilhermino M, Ribeiro R. 2004. An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13:667-681.
- Choi J-H. 2004. Biomarkers in Environmental Monitoring and its Application in *Chironomus* spp. In: Hong S-K, et al. (Eds.). *Ecological Issues in a Changing World – Status, Response and Strategy*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp 203-215.
- CICOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Químicas, México. 2004a. DDT. (En línea: <http://www.hclrss.demon.co.uk/index-iupac-d.htm>). Acceso: 25 de febrero de 2010.

- 2004b. Methyl Parathion. (En línea: <http://www.hclrss.demon.co.uk/index-iupac-d.htm>). Acceso: 25 de febrero de 2010.
- Clément P, Wurdak E. 1991. Rotifera. In: Harrison FW, Ruppert EE. (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York: Wiley-Liss, Inc. pp 219-297.
- Connell DW. 2005. *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. 2nd ed. Boca Ratón, FL: Taylor and Francis Group. 465p.
- Cummings BS, Mchowat J, Schnellmann RG. 2000. Phospholipase A2s in cell injury and death. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294:793-799.
- De Araujo AB, Snell TW, Hagiwara A. 2000. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Research* 31:359-365.
- De Araujo AB, Hagiwara A, Snell TW. 2001. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on reproduction and enzyme activity of the rotifer *Brachionus roduntiformis*. *Hydrobiologia* 446/447:363-368.
- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology* 84:236-246.
- Devine GJ, Furlong MJ. 2007. Insecticide Use: Contexts and Ecological Consequences. *Agriculture and Human Values* 24:281-306.
- Di Giulio RT, Newman MC. 2008. Ecotoxicology. In: Klaassen CD. (Ed.). *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7th ed. New York: McGraw-Hill. pp 1157-1187.
- Díaz-Báez MC, Bustos-López MC, Espinosa-Ramírez AJ. 2004. Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 116p.
- Dodson SI. 2005. Introduction of Limnology. New York: McGraw-Hill. 400p.
- Duggan IC. 2001. The ecology of periphytic rotifers. *Hydrobiologia* 446/447:139-148.
- Duquesne S. 2006. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:145-150.
- Ejsmont-Karabin J, Siewertsen K, Gulati RD. 1993. Changes in size, biomass and production of *Euchlanis dilatata lucksiana* Hauer during its lifespan. *Hydrobiologia* 255/256:77-80.
- Elías GM, Sarma SSS. 1999. Zooplankton de sistemas acuáticos epicontinentales mexicanos en la región central de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe Final SNIB-CONABIO Proyecto H112. México, D.F. 65p.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. 2006. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: Their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacological Reviews* 58:591-620.
- Fernández-Casalderrey A, Ferrando MD, Andreu-Moliner E. 1992. Acute toxicity of several pesticides to rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48:14-17.

- Fernández-Casalderrey F, Ferrando FM, Andreu-Moliner E. 1993. Effect of the insecticide methylparathion on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*. *The Science of the Total Environment*, Supplement: 867-876.
- Fisher NS, Hook SE. 2002. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology* 181-182:531-536.
- Forget J, Beliaeff B, Bocquené G. 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology* 62:195-204.
- Fulton MH, Key PB. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:37-45.
- Gama-Flores JL. 2001. *Estudio crónico conjunto del paratión metílico y densidad alimenticia (Chlorella vulgaris): efectos a nivel poblacional de especies de rotíferos seleccionados*. Tesis Maestría en Ciencias, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. 54p.
- Gama-Flores JL, Sarma SSS, Nandini S. 2004. Acute and chronic toxicity of the pesticide methyl parathion to the rotifer *Brachionus angularis* (Rotifera) at different algal (*Chlorella vulgaris*) food densities. *Aquatic Ecology* 38:27-36.
- Gaona MX. 2004. *El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente*. Tesis de Doctorado. Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona, España. 139p.
- García-García G, Picazo-Páez EA, Nandini S, Sarma SSS. 2007. Combined effects of sediment and lead (PbCl₂) on the demography of *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Hydrobiologia* 593:209-218.
- García-Morán GA, Gaitán A, García A, Clavijo D, Mejía O, Cobos C, Casadiego C. 2008. Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2 en la especie humana. *Med UNAB* 11:14-27.
- Garzón LT. 2003. *Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 95p.
- Gómez GA. 1996. *Ecología genética y sistemas de reconocimiento de pareja en poblaciones simpátricas de rotíferos*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España. 226p.
- Guzzella L, Gronda A, Colombo L. 1997. Acute toxicity of organophosphorus insecticides to marine invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59:313-320.
- Handy RD, Galloway TS, Depledge MH. 2003. A proposal for the use of markers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12:331-343.
- Hendrickson HS. 1994. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases and other lipolytic enzymes. *Analytical Biochemistry* 219:1-8.
- Hernández-Flores S, Rico-Martínez R. 2006. Study of the effects of Pb and Hg toxicity using a chronic toxicity reproductive 5-day test with the freshwater rotifer *Lecane quadridentata*. *Environmental Toxicology* 21:533-540.

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2009a. Comunicado Num. 027/10: Industria Minerometalúrgica en México durante Noviembre de 2009. (En línea: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/comunicados/minbol.asp>). Acceso: 31 de enero de 2010.
- _____. 2009b. Banco de Información Económica. Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica. (En línea: <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe>). Acceso: 31 de enero de 2010.
- ISAT. Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo S.C. Diagnóstico situacional del uso de DDT y el control de la malaria. (En línea: www.cec.org/Storage/44/3646_InfRegDDTb_ES_EN.pdf). Acceso: 24 de agosto de 2010.
- Izquierdo MS, Henderson RJ. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiology and Biochemistry* 19:153-162.
- Jaramillo JF, Rodríguez VML, Meléndez CME, Aldana MML. 2009. Toxicología de los Plaguicidas. En: *Toxicología Ambiental*. Jaramillo Juárez F, Rincón Sánchez AR, Rico Martínez R. (Eds.). Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp 287-322.
- Juárez-Franco MF, Sarma SSS, Nandini S. 2007. Effect of cadmium and zinc on the population growth of *Brachionus havanaensis* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42:1489-1493.
- Kashiwada S, Mochida K, Adachi Y, Kimura S, Ozoe Y, Nakamura T. 2002. Influence of Fenotrothion-exposure on the metabolic activity of a rotifer (*Brachionus plicatilis*) to organophosphorus insecticides. *Journal of Pesticides Science* 27:59-63.
- Kawakami T, Takezawa A, Nishi I, Watanabe E, Ishizaka M, Eun H, Onodera S. 2008. Monitoring of cholinesterase-inhibiting activity in water from the Tone canal, Japan, as a biomarker of ecotoxicity. *Ecotoxicology* 17:221-228.
- Križaj I, Gubenšek F. 2000. Neuronal receptors for phospholipases A2 and β -neurotoxicity. *Biochimie* 82:807-814.
- Landis WG, Yu M-H. 2004. *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals upon Ecological Systems*. 3rd ed. New York: Lewis Publishers. 484p.
- Locatello L, Matozzo V, Marin MG. 2009. Biomarker responses in the crab *Carsinus aestuarii* to assess environmental pollution in the Lagoon of Venice (Italy). *Ecotoxicology* 18:869-877.
- Maldonado VM, González RJD, Jaramillo JF. 2009. Toxicología de los Metales. En: *Toxicología Ambiental*. Jaramillo Juárez F, Rincón Sánchez AR, Rico Martínez R. (Eds.). Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp 259-285.
- Mancera-Rodríguez NJ, Álvarez-León R. 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 11:3-23.
- Mangas-Ramírez E, Sarma SSS, Nandini S. 2004. Recovery patterns of *Moina macrocopa* exposed previously to different concentrations of cadmium and methyl parathion: life-table demography and population growth studies. *Hydrobiologia* 526:255-265.

- Marcial HS, Hagiwara A, Snell TW. 2005. Effect of some pesticides on reproduction of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia* 546:569-575.
- Martínez-Jerónimo F, Muñoz-Mejía G. 2007. Evaluation of the sensitivity of three cladoceran species widely distributed in Mexico to three reference toxicants. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42:1417-1424.
- Martínez-Jerónimo F, Rodríguez-Estrada J, Martínez-Jerónimo L. 2008. *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustacea: Cladocera). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 24:153-159.
- Massoullie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Valette FM. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progress in Neurobiology* 41:31-91.
- McDaniel M, Snell TW. 1999. Probability distributions of toxicant sensitivity for freshwater rotifer species. *Environmental Toxicology* 14:361-366.
- Mejía-Saavedra J, Sánchez-Armas S, Santos-Medrano G, González-Amaro R, Razo-Soto I, Rico-Martínez R, Díaz-Barriga F. 2005. Effect of co-exposure to DDT and manganese of freshwater invertebrates: Pore water from contaminated rivers and laboratory studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2037-2044.
- Mendoza-Cantú A, Raírez-Romero P, Pica-Granados Y. 2007. Environmental legislation and aquatic ecotoxicology in Mexico: Past, present and future scenarios. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42:1343-1348.
- Menéndez DF. 2005. Higiene Industrial. Manual para la Formación del Especialista. Valladolid: Editorial Lex Nova. 580p.
- Mora SM. 2007. *Determinación de parámetros fisicoquímicos y metales pesados en suelos y sedimentos del cauce del río San Pedro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. 119 p.
- Nandini S, Chaparro-Herrera D, Cárdenas-Arriola SL, Sarma SSS. 2007. Population growth of *Brachionus macracanthus* (Rotifera) in relation to cadmium toxicity: Influence of algal (*Chlorella vulgaris*) density. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42:1467-1472.
- Neet KE. 1995. Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *Methods in Enzymology* 249:519-567.
- Newman MC, Unger MA. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2nd ed. New York: Lewis Publishers. 458p.
- Nichols HW. 1973. Growth media-freshwater. In: Stein JR (Ed.). *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge, MA: Cambridge University Press. pp 7-24.
- Norma Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI. Análisis de Agua – Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Método de Prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, México. 39p.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1989. Toxicity to aquatic organisms. DDT and its derivatives: Environmental Aspects. Environmental Health Criteria 83. WHO, Geneva, Switzerland.

- Palacio BJA. 2007. *Ecotoxicología Acuática*. Medellín (Col.): Editorial Universidad de Antioquia. 437p.
- Peakall DB, Kennedy S. 1999. Introduction to the Special Issue on Biomarkers. *Ecotoxicology* 8:327.
- Peña CE, Carter DE, Ayala-Fierro F. 2001. *Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. 203 p (En línea: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb>). Acceso: 07 de junio de 2009.
- Pérez-Legaspi IA, Rico-Martínez R. 2001. Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia* 446/447:375-381.
- Pérez-Legaspi IA, Rico-Martínez R, Pineda-Rosas A. 2002. Toxicity testing using esterase inhibition as a biomarker in three species of the genus *Lecane* (Rotifera). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:776-782.
- Pérez-Legaspi IA, Rico-Martínez R. 2003. Phospholipase A2 activity in three species of littoral freshwater rotifers exposed to several toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:2349-2353.
- Pérez LIA. 2008. Estudio de los efectos de dos plaguicidas en el sistema colinérgico en especies selectas de rotíferos dulceacuícolas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 115p.
- Pérez-Legaspi IA, Quintanar JL, Rico-Martínez R. 2010. Comparing toxicity endpoints on *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta) exposed to two anticholinesterases pesticides. *Environmental Toxicology* (in press).
- Pestana JLT, Ré A, Nogueira AJA, Soares AMVM. 2007. Effects of cadmium and zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere* 68:1556-1562.
- Peterson B, Knotts T, Cummings BS. 2007. Involvement of Ca²⁺-independent phospholipase A2 isoforms in oxidant-induced neural cell death. *Neurotoxicology* 28:150-160
- Preston BL, Snell TW, Dusenbery DB. 1999. The effects of sublethal pentachlorophenol exposure on predation risk in freshwater rotifer species. *Aquatic Toxicology* 47:93-105.
- Quintaneiro C, Monteiro M, Pastorinho R, Soares AMVM, Nogueira AJA, Morgado F, Guilhermino L. 2006. Environmental pollution and natural populations: A biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin* 52:1406-1413.
- Raimondo S, Vivian DN, Barron MG. 2009. Standardizing acute toxicity data for use in ecotoxicology models: influence of test type, life stage, and concentration reporting. *Ecotoxicology* 18:918-928.
- Ramírez A. 2002. Toxicología del Cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina* 63:51-64.
- Rank J, Lehtonen K, Strand J, Laursen M. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* 84:50-61.

- Rao TR, Sarma SSS. 1986. Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia* 139:193-200.
- Regel RH, Ferris JM, Ganf GG, Brookes JD. 2002. Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology* 59:209-223.
- Rendón von Osten J. 2005. Uso de biomarcadores em ecosistemas acuáticos. In: Botello AV, Rendón von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz Hernández C. (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2da ed. Univ. Autón. de Campeche. Univ. Nat. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. pp 121-140
- Rico-Martínez R, Silva-Briano M. 1993. Contribution to the knowledge of the rotifera of Mexico. *Hydrobiologia* 255/256:467-474.
- Rico MR, Velázquez RCA, Pérez LIA, Santos MGE. 2001. The use of aquatic invertebrate toxicity tests and invertebrate enzyme biomarkers to assess toxicity in the states of Aguascalientes and Jalisco, Mexico. In: Butterworth FM, Gunatilaka A, Gonsebatt MA (Eds.). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Handbook 2. pp 427-438.
- Rico MR. 2008. Biomarcadores. En: *La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (CONABIO), Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes y Universidad Autónoma de Aguascalientes (Eds.). México. pp 205-207.
- Roberts MF. 1996. Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J* 10:1159-1172.
- Sakai M. 2006. Acute toxic tests of rainwater samples using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:215-220.
- Sarma SSS. 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from Mexico. *Environment and Ecology* 17:978-983.
- Sarma SSS, Ramírez-Pérez T, Nandini S. 2000. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64:735-739.
- Sarma SSS, Nandini S, Gama-Flores JL. 2001. Effect of methyl parathion on the population growth of the rotifer *Brachionus patulus* (O. F. Müller) under different algal food (*Chlorella vulgaris*) densities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48:190-195.
- Serrano GR. 2003. Introducción al análisis de datos experimentales: Tratamiento de datos en bioensayos. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universidad Jaume I. España. 189p.
- Scholten MC, Foekema EM, van Dokkum HP, Kaag NHBM, Jak RG. 2005. *Eutrophication Management and Ecotoxicology*. The Netherlands: Springer. 122p.
- Segers H. 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera) with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* 1564:1-104.
- Snell TW, Moffat BD, Janssen C, Persoone G. 1991a. Acute toxicity tests using rotifers IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21:308-317.

- Snell TW, Moffat BD, Janssen C, Persoone G. 1991b. Acute toxicity tests using rotifers III. Effects of temperature, strain, and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6:63-75.
- Snell TW, Janssen CR. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313/314:231-247.
- Snell TW, Joaquim-Justo C. 2007. Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia* 593:227-232.
- Torres-Guzmán F, Avelar-González FJ, Rico-Martínez R. 2010. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:287-295.
- United States Environmental Protection Agency. 1989. An LC/MS Performance Evaluation Study of Organophosphorus Pesticides. EPA-600-X-89-006, Washington, D.C., USA.
- United States Environmental Protection Agency. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, Washington, D.C., USA. 266p.
- Valle L. 2006. *Estudio de la contaminación por los metales mercurio y manganeso en los ríos de la Huasteca Potosina Sur*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 97 p.
- Valverde VJL, Pérez DJJ, Corbella J. 2001. *Manual de Toxicología Medioambiental Forense*. Madrid: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces, S.A. 361p. (En línea: <http://books.google.com.mx/books?id=9tDnpWpdopAC>). Acceso: 25 de noviembre de 2009.
- Varó I, Amat F, Navarro JC. 2008. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Aquatic Toxicology* 88:53-61.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (Eds.). 2006. *Principles of Toxicology*. 3th ed. New York: Taylor & Francis Group. 315p.
- Wallace RL, Snell TW, Ricci C, Nogrady T. 2006. Rotifera. Biology, Ecology and Systematics. In: Dumont HJF (Ed.). *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Chapter 23. 2nd ed. The Netherlands: Kenobi Productions, Ghent, Belgium and Backhuys Publishers, Leiden. 299p.
- Wallace RL, Walsh EJ, Schröder T, Rico-Martínez R, Ríos-Arana JV. 2008. Species composition and distribution of rotifers in Chihuahuan desert waters of México: is everything everywhere? *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 30:73-76.
- Walsh E. 1995. Habitat-specific predation susceptibilities of a littoral rotifer to two invertebrate predators. *Hydrobiologia*, 313/314: 205-211.
- Walter H, Consolaro F, Gramatica P, Scholze M, Altenburger R. 2002. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effects concentrations (NOEC's). *Ecotoxicology* 11:299-310.
- Water Pollution Control Federation, American Water Works Association, American Public Health Association. 1989. Standard methods for examination of water and wastewater: including bottom sediments and sludges. New York: American Public Health Association.

Xi Y-L, Hu H-Y. 2003. Effect of thiophanate-methyl on the reproduction and survival of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71:722-728.

Yarto-Ramírez M, Gavilán-García A, Castro-Díaz J. 2004. La contaminación por mercurio en México. Instituto Nacional de Ecología, México. *Gaceta Ecológica* 72:21-34.

Ziegenfuss PS, Renaudette WJ, Adams WJ. 1986. Methodology for assessing the acute toxicity of chemicals sorbed to sediments: Testing the equilibrium partitioning theory. In: Poston TM, Purdy R. (Eds.) *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*. Philadelphia, PA, USA. 9: 479-493.

ANEXO 1:**MEDIOS PARA EL CULTIVO DE ROTIFEROS Y ALGA**

1. MEDIO EPA (Environmental Protection Agency) (US EPA, 2002):

Agua sintética ligeramente dura

Reactivo	Cantidad (mg)
KCl	4
CaSO ₄ .2H ₂ O	60
MgSO ₄ .7H ₂ O	60
NaHCO ₃	96

Notas:

- Las cantidades indicadas son disueltas en 1 litro de agua desionizada.
- El pH de la solución es ajustado a 7.5 con HCl o NaOH 0.1 N, según sea requerido.
- Conservación a temperatura ambiente en el laboratorio.
- Periodicidad de recambio de este medio: 15 días.

2. MEDIO BASAL BOLD (Nichols, 1973):

Reactivo	Cantidad (mg)
NaCl	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaNO ₃	250

Notas:

- Las cantidades indicadas son disueltas en 1 litro de agua desionizada.
- Esterilización del medio con los macronutrientes (20 minutos).
- Adición de 2 ml de cada solución de vitaminas y metales traza por litro preparado.

Solución de Vitaminas	Cantidad (mg)	Solución de Metales Traza	Cantidad (mg)
Vitamina B12	10	NaFeEDTA	5
Biotina	10	MnCl ₂ .4H ₂ O	180
Tiamina	200	CuSO ₄ .5H ₂ O	10
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	22
		CoCl ₂ .6H ₂ O	10
		NaMoO ₄ .2H ₂ O	6.4

- Inoculación del alga *Nannochloris oculata* (\approx 5-6ml).
- Aireación e iluminación constantes durante 4-5 días hasta lograr tonalidad verde oscuro del cultivo.
- Periodicidad de recambio de este alimento: 8-10 días.